

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Caractérisation de la région promotrice du gène codant pour le
récepteur du peptide insulinothéropé dépendant du glucose humain**

Par

Valérie Baldacchino

Département de Sciences Biomédicales

Vice-Décanat Recherche et Études Supérieures

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (PhD)

Avril 2006

©Valérie Baldacchino



Université de Montréal

Vice-Décanat Recherche et Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de la région promotrice du gène codant pour le récepteur du
peptide insulinothéropé dépendant du glucose humain

Présentée par

Valérie Baldacchino

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président du jury : Vincent Poitout

Membre du jury : Sophie Vallette

Examineur externe : Gaétan Guillemette

Directeur de recherche : André Lacroix

Co-directrice de recherche : Johanne Tremblay

Thèse acceptée le :

RÉSUMÉ

Le syndrome de Cushing regroupe l'ensemble des symptômes dus à une exposition prolongée des tissus à des niveaux supraphysiologiques de glucocorticoïdes et en particulier du cortisol. La présence d'un adénome hypophysaire qui sécrète l'hormone adrénocorticotrope (ACTH), le principal facteur de régulation de la sécrétion du cortisol, est responsable de l'apparition et de la progression de la maladie chez la plupart des patients. Cependant, il est également possible que la production excessive de cortisol résulte d'une tumeur unilatérale ou d'une hyperplasie bilatérale primaire du cortex surrénalien qui sécrètent du cortisol de manière autonome. Récemment, un nombre croissant d'études a montré que dans une proportion importante de ces cas, la stéroïdogénèse et la prolifération tumorale peuvent se trouver sous le contrôle d'un récepteur hormonal exprimé de manière aberrante à la surface des cellules corticosurréaliennes.

Le syndrome de Cushing dépendant du peptide insulinoïdique dépendant du glucose (GIP) résulte de l'expression ectopique du récepteur au GIP (GIPR) non muté dans la corticosurrénale. L'objectif de cette étude est de mieux caractériser les mécanismes qui régulent l'expression du GIPR en physiologie normale et chez les patients souffrant du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Le séquençage d'une région de 9 kb en amont du site d'initiation de la traduction a permis d'identifier onze polymorphismes. Toutefois, ces polymorphismes sont présents dans les mêmes proportions chez les patients et dans le groupe témoin, ce qui exclut leur implication dans le développement de cette pathologie.

La caractérisation de la région promotrice proximale du gène codant pour le GIPR humain (hGIPR) nous a permis de mettre en évidence la présence de quatre boîtes GC et de deux boîtes GT fonctionnelles en transfections

transitoires. L'utilisation de la technique de retard sur gel a également permis de montrer que cette région est capable de lier les facteurs de transcription Sp1 et Sp3, ce qui suggère un rôle possible pour ces deux protéines dans l'expression normale du hGIPR. Nous avons aussi démontré que le niveau d'expression de Sp3 et de CRSP₃₃, un cofacteur essentiel à l'activité de Sp1, est augmenté chez les patients par rapport au groupe témoin. Cependant, une augmentation similaire est observée chez la plupart des patients souffrant d'un syndrome de Cushing non dépendant du GIP, ce qui indique que l'expression anormale de ces deux protéines ne peut, à elle seule du moins, expliquer l'expression ectopique du GIPR. Le séquençage du domaine inhibiteur de Sp3 n'a pas non plus permis d'identifier de mutations susceptibles d'expliquer l'activité accrue du promoteur chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Notre étude s'est principalement concentrée sur la région proximale du promoteur. Cependant, l'analyse de la région distale a également mis en évidence des régions potentiellement impliquées dans la régulation de l'expression du hGIPR. Une de ces régions contient deux éléments de régulation négative par le calcium (nCaRE). Une région où l'activité du promoteur est fortement réprimée a aussi été identifiée.

Finalement, nous avons observé une baisse du niveau d'ARNm de plusieurs enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse chez les patients souffrant du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Le niveau d'ARNm de certains des facteurs de transcription qui régulent leur expression est également diminué chez ces patients, ce qui suggère que malgré le rôle important de l'expression ectopique du GIPR dans la stéroïdogénèse et dans la prolifération cellulaire, d'autres événements génétiques surviennent dans la corticosurrénale des patients souffrant du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Les résultats obtenus jusqu'à présent n'ont pas permis d'identifier le mécanisme moléculaire responsable de l'expression ectopique du GIPR dans les cellules du cortex surrénalien. Toutefois, cette étude apporte de nouvelles données sur les mécanismes de régulation de l'expression du hGIPR en physiologie normale. De plus, les observations faites au cours de ces recherches ouvrent la voie à de nouvelles orientations qui pourront conduire à une meilleure compréhension de l'expression ectopique du GIPR chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Mots clés

Glandes surrénales, Syndrome de Cushing, Expression ectopique, Récepteurs hormonaux, GIP, GIPR, Sp1, Sp3, CRSP₃₃

SUMMARY

Cushing's syndrome results from excess cortisol production by the adrenal gland. Most often this is due to adrenocorticotropin hormone (ACTH) secretion by a pituitary adenoma, but in about 20 % of patient the cause is adrenal unilateral tumours or bilateral hyperplasias. Recent studies have shown that the aberrant / ectopic expression of a diversity of G protein-coupled hormone receptors is implicated in the pathophysiology of a significant proportion of these cases. One of these is the receptor for the glucose dependent insulinotropic polypeptide (GIPR), a peptide involved in the regulation of insulin secretion in normal subjects.

Molecular mechanisms involved in the expression of GIPR in normal physiology or in its ectopic expression in the adrenal cortex of patients with GIP-dependant Cushing's syndrome are still unknown. In this study, we characterized the promoter region of the human GIPR (hGIPR) to gain better understanding of these mechanisms. We sequenced 9 kb upstream the start codon and identified 11 polymorphisms that are found in similar proportions in the patients and the controls indicating no probable association with the disease. This suggests that abnormalities in transcription factors or co-factor expression or regulation could be involved in the ectopic expression of the GIPR.

The characterization of the proximal promoter region of the hGIP-R gene revealed six consensus sequences important in regulating the reporter gene activity and capable of binding to Sp1 and Sp3 transcription factors. Data obtained by gene array and semi-quantitative RT-PCR showed an increase in the expression of Sp3 and CRSP₃₃ in the adrenal adenomas or hyperplasias of patients with GIP-dependent Cushing's syndrome. However similar results were observed in most of patients with non GIP-dependent Cushing's syndrome suggesting that the level of expression of these proteins are not involved in the ectopic expression of the GIPR. We also sequenced the inhibitory domain of

Sp3 and found no mutation that could affect the activity of the GIPR promoter in patients.

We characterized a more distal region of the promoter and identified potential regulatory regions interesting for further studies. One of these regions contains two negative calcium response elements (nCaRE). A region with highly repressive activity in transient transfection has also been found.

Finally we observed a decrease in the mRNA level of several genes involved in steroidogenesis and some of the transcription factors that control their expression suggesting that although the expression of aberrant receptors plays an important role in steroidogenesis and initiation of cell proliferation, additional genetic events might occur, altering the activity of the ACTHR pathway.

The molecular mechanisms involve in the ectopic expression of the GIPR in GIP-dependent Cushing's syndrome are still unknown. However this study gives new informations about the regulation of the GIPR expression in normal physiology and new directions for further studies.

Key words

Adrenal glands, Cushing's syndrome, Abnormal hormone receptors, GIP, GIPR, Sp1, Sp3, CRSP₃₃

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	<i>iii</i>
SUMMARY	<i>vi</i>
LISTE DES TABLEAUX	<i>xiv</i>
LISTE DES FIGURES	<i>xv</i>
LISTE DES ABRÉVIATIONS	<i>xviii</i>
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	
1.1 Les glandes surrénales	2
1.1.1 La médulla	5
1.1.2 Le cortex	9
1.1.3 Les hormones stéroïdiennes	11
1.1.3.1 Les minéralocorticoïdes	12
1.1.3.2 Les glucocorticoïdes	16
1.1.3.3 Les hormones sexuelles	24
1.2 Syndrome de Cushing	25
1.2.1 Le syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH	26
1.2.1.1 La maladie de Cushing	27
1.2.1.2 La sécrétion ectopique d'ACTH	28
1.2.1.3 Autres cas	29
1.2.2 Syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH	29
1.2.2.1 Les tumeurs corticosurréaliennes	30
1.2.2.2 La dysplasie micronodulaire pigmentaire	36
1.2.2.3 L'hyperplasie macronodulaire	37
1.2.2.4 Autres cas	39
1.2.3 Expression aberrante de récepteur hormonaux dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing	39

1.3	Le GIP	48
1.3.1	Les principales cibles du GIP	50
1.3.2	GIP et signalisation intracellulaire	55
1.3.3	La régulation de l'expression du GIPR	62
1.4	Régulation de l'expression génique	63
1.4.1	Les niveaux de contrôle	63
1.4.1.1	L'acétylation des histones	63
1.4.1.2	La méthylation de l'ADN	67
1.4.1.3	Les facteurs de transcription	68
1.4.1.4	Les autres points de contrôle	72
1.4.2	Transcription basale des promoteurs TATA	76
1.4.3	Transcription basale des promoteurs sans boîte TATA	77
1.4.3.1	Facteurs de transcription de la famille Sp / KLF	79
1.4.3.2	Co-facteurs impliqués dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription Sp	89
1.4.3.3	Maladies génétiques et facteurs de transcription Sp	92
1.4.4	Aberrations transcriptionnelle	94

CHAPITRE 2 MÉTHODES

2.1	Expression du GIP-R dans les tissus humains	101
2.1.1	Transfert en points	101
2.1.1.1	Préparation de la sonde	101
2.1.1.2	Hybridation	101
2.1.2	Transcription inverse	101
2.1.3	PCR	102
2.2	Expression du GIPR dans les échantillons de tissu surrénalien	102
2.2.1	Échantillons	102
2.2.2	Transcription inverse et PCR	103

2.3 Expression du GIPR dans les lignées cellulaires humaines	103
2.3.1 Culture cellulaire	103
2.3.2 Transcription inverse et PCR	103
2.4 Préparation des fragments du promoteur du hGIPR	104
2.4.1 Isolement de l'ADN génomique	104
2.4.2 Amplification par PCR	105
2.4.2.1 Amplification des fragments de type sauvage	104
2.4.2.2 Amplification des fragments de type muté	105
2.4.2.3 Amplification des régions nCaRE	107
2.4.3 Purification des produits de PCR	107
2.5 Insertion des fragments du promoteur du hGIPR dans le vecteur luciférase pGL-3 Basic	107
2.5.1 Préparation du vecteur	108
2.5.2 Insertion des fragments proximaux dans le vecteur gwpGL-3 Basic	108
2.5.3 Insertion des fragments nCaRE dans le vecteur pGL-3 promoter	108
2.5.4 Insertion du fragment inhibiteur dans le vecteur pGL-3 promoter	109
2.5.5 Digestion et séquençage	109
2.6 Transfections	109
2.6.1 Transfections des fragments proximaux	109
2.6.2 Transfection des éléments nCaRE	110
2.6.3 Transfection du fragment inhibiteur	110
2.7 Retardement sur gel	111
2.7.1 Extraits nucléaires cellulaires	111
2.7.2 Extraits nucléaires tissulaires	111
2.7.3 Migration des échantillons	112

2.7.3.1	Identification des sites de liaison	112
2.7.3.2	Comparaison des complexes observés à l'aide d'extraits nucléaires GIPR ⁺ et GIPR ⁻	113
2.7.3.3	Caractérisation des éléments nCaRE	114
2.7.3.4	Caractérisation du fragment inhibiteur	115
2.8	Expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 et du co-facteur CRSP ₉	115
2.8.1	Expression du facteur de transcription Sp1	115
2.8.1.1	Amplification par PCR multiplex	115
2.8.1.2	Immunobuvardage de Western	116
2.8.2	Expression du facteur de transcription Sp3	116
2.8.2.1	Amplification par PCR multiplex	116
2.8.2.2	Immunobuvardage de Western	117
2.8.3	Expression du co-facteur CRSP ₃₃	117
2.8.3.1	Amplification par PCR multiplex	117
2.9	Séquençage de la région d'acétylation de Sp3	118

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

3.1	Analyse de la séquence nucléotidique du promoteur du hGIP-R	120
3.2	Expression de l'ARNm du GIP-R dans les tissus humains	123
3.3	Identification des facteurs de transcription capable de lier la région proximale du promoteur	125
3.3.1	Expression du GIP-R dans les lignées cellulaires humaines	125
3.3.2	Transfection des fragments de délétion du promoteur du hGIP-R dans les HGT-1	126
3.3.3	Analyse de la région proximale du hGIP-R	127

3.3.4 Transfection des fragments de délétion du promoteur proximal du hGIP-R dans les HGT-1	128
3.3.5 Transfection des fragments mutés du promoteur du hGIP-R dans les HGT-1	129
3.3.6 Retardement sur gel	130
3.3.7 Comparaison de l'activité luciférase des fragments du promoteur proximal du hGIP-R dans les HGT-1 et les HeLa	133
3.3.8 Expression des facteurs de transcription Sp1	134
3.3.8.1 Expression du GIP-R	135
3.3.8.2 Expression des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 et du co-facteur CRSP9 dans les HGT-1 et les HeLa	135
3.3.8.3 Niveau d'expression du facteur de transcription Sp1 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	137
3.3.8.4 Niveau d'expression du facteur de transcription Sp3 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	139
3.3.8.5 Niveau d'expression du co-facteur CRSP9 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	141
3.3.9 Comparaison des complexes observés à l'aide d'extraits nucléaires GIP-R ⁺ et GIP-R ⁻	142
3.3.10 Analyse de la séquence nucléotidique du facteur de transcription Sp3	146
3.4 Éléments de réponses distaux	148
3.4.1 Région inhibitrice	148
3.4.2 Éléments de réponse nCaRE	151

CHAPITRE 4 DISCUSSION

4.1 Analyse de la séquence nucléotidique du promoteur du hGIPR	157
4.2 Distribution tissulaire du GIPR	160

4.3 Analyse de la région proximale du hGIPR	165
4.4 Expression de Sp1, Sp3 et SCRP ₃₃	172
4.5 Séquençage de Sp3	174
4.6 Analyse de la région distale du hGIPR	175
4.7 Conclusion	179

BIBLIOGRAPHIE	180
----------------------	-----

ANNEXE I ARTICLE 1	223
--------------------	-----

Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome.

ANNEXE II ARTICLE 2	231
---------------------	-----

The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenals of patients with Cushing's syndrome.

ANNEXE III ARTICLE 3	243
----------------------	-----

Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors.

ANNEXE IV ARTICLE 4	252
---------------------	-----

Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome.

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Tableau 1,1. Synthèse hormonale par l'adénohypophyse	20
Tableau 1,2. Étiologies du syndrome de Cushing	27

CHAPITRE 2 MÉTHODES

Tableau 2,1. Amorces utilisées pour l'amplification du promoteur du hGIP-R	105
Tableau 2,2. Amorces utilisées pour l'amplification des fragments mutés du promoteur du hGIP-R	106
Tableau 2,3. Sondes utilisées pour les essais de retardement sur gel	112
Tableau 2,4. Sondes mutées utilisées pour les essais de retardement sur gel	113
Tableau 2,5. Sondes utilisées pour les essais de retardement sur gel	114

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

Tableau 3,1. Variations nucléotidiques observées dans la région -800 pb à 1 233 pb	121
Tableau 3,2. Polymorphismes identifiés dans le promoteur distal du hGIP-R	122

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Figure 1,1. Anatomie des glandes surrénales	4
Figure 1,2. Synthèse des catécholamines	5
Figure 1,3. Catabolisme des catécholamines	6
Figure 1,4. Histologie fonctionnelle de la glande surrénale	11
Figure 1,5. Conversion du cholestérol en prégnénolone	12
Figure 1,6. La synthèse des hormones stéroïdiennes dans le cortex surrénalien	13
Figure 1,7. Métabolisme de l'angiotensine	15
Figure 1,8. ACTH et signalisation intracellulaire	21
Figure 1,9. Axe hypothalamo-hypophysaire	22
Figure 1,10. Synthèse de l'ACTH à partir de son précurseur, le POMC	23
Figure 1,11. Mécanisme de rétrocontrôle du cortisol	24
Figure 1,12. Régulation de l'expression génique de H19 et IGF-II	35
Figure 1,13. GIP et signalisation intracellulaire	56
Figure 1,14. Acétylation des histones	65
Figure 1,15. Les domaines de liaison à l'ADN	69
Figure 1,16. Les domaines activateurs	71
Figure 1,17. Maturation de l'ARNm	74
Figure 1,18. Épissage des introns	75
Figure 1,19. Facteur de transcription Sp1	81

CHAPITRE 3 RÉSULTATS

Figure 3,1. Distribution tissulaire de l'ARNm du GIP-R chez l'adulte et le fœtus humain	124
Figure 3,2. Expression de l'ARNm du GIP-R dans les lignées cellulaires humaines	126

Figure 3,3. Analyse fonctionnelle du promoteur du hGIP-R	127
Figure 3,4. Analyse de la région proximale du hGIP-R	128
Figure 3,5. Analyse fonctionnelle du promoteur du hGIP-R	129
Figure 3,6. Analyse fonctionnelle du promoteur du hGIP-R à l'aide de fragments mutés	130
Figure 3,7. Liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3	131
Figure 3,8. Contrôle de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3	132
Figure 3,9. Comparaison de l'activité du promoteur du hGIP-R dans les HGT-1 et les HeLa	134
Figure 3,10. Expression de l'ARNm du GIP-R dans les tissus surrénaliens humains	135
Figure 3,11. Niveau d'expression de l'ARNm des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 et du co-facteur CRSP9 dans les HGT-1 et les HeLa	136
Figure 3,12. Niveau d'expression protéique des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 et du co-facteur CRSP9 dans les HGT-1 et les HeLa	137
Figure 3,13. Niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp1 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	138
Figure 3,14. Niveau d'expression protéique du facteur de transcription Sp1 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	138
Figure 3,15. Niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp3 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	140
Figure 3,16. Niveau d'expression protéique du facteur de transcription Sp3 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	140
Figure 3,17. Niveau d'expression de l'ARNm du co-facteur CRSP9 dans les échantillons de tissu surrénalien humain	142
Figure 3,18. Affinité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3	144

Figure 3,19. Affinité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3	144
Figure 3,20. Affinité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3	145
Figure 3,21. Séquençage d'une région de 500 bp dans la région codante du facteur de transcription Sp3	147
Figure 3,22. Analyse fonctionnelle de la région inhibitrice du promoteur du gène codant pour le hGIPR	149
Figure 3.23. Formation de complexes spécifiques entre la région inhibitrice du promoteur du hGIPR et les extraits nucléaires de cellules HeLa et HGT-1	150
Figure 3.24. Analyse de la région du promoteur du hGIPR située entre -381 pb et -500 pb	150
Figure 3,25. Séquence nucléotidique de la région promotrice du hGIPR qui contient les deux éléments nCaRE	151
Figure 3,26. Comparaison de la séquence nucléotidique des éléments nCaRE GIPR avec la séquence consensus nCaRE PTH	152
Figure 3,27. Analyse fonctionnelle des éléments nCaRE identifiés dans le promoteur du hGIPR	153
Figure 3,28. Expression de l'ARNm du GIPR dans les HeLa en présence de 0,3 mM ou de 3 mM CaCl ₂	154

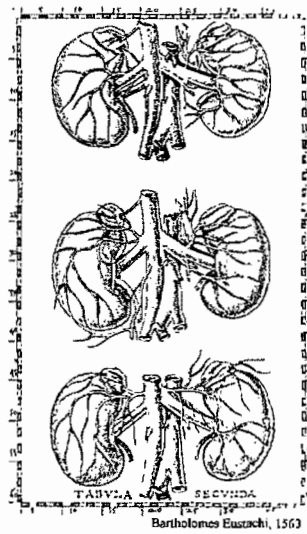
LISTE DES ABRÉVIATIONS

3 β -HSD	3 β -désydrogénase
5-HT ₄	récepteur à la sérotonine
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ACTH	hormone adrénocorticotrope ou corticotropine
ADH	hormone antidiurétique
ADN	acide désoxyribonucléique
Adx	adrénodexine
AIMAH	hyperplasie macronodulaire bilatérale
Ang II	angiotensine II
ANP	facteur natriurétique
ARN	acide ribonucléique
ARN _m	ARN messenger
BTEB	basic transcription element binding protein
C	cytosine
CaCl ₂	dichlorure de calcium
CREB	cyclic adenosine monophosphate response element binding protein
CRH	corticolibérine
dATP	déoxyadénosine triphosphate
dCTP	déoxycytosine triphosphate
dGTP	déoxyguanosine triphosphate
dTTP	déoxythymidine triphosphate
DHEA	déhydroépiandrostérone
DHEA-S	sulfate de déhydroépiandrostérone
EDTA	sel disodique d'éthylène diamine tetra acétate
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FBS	sérum fœtal bovin
FSH	
G	guanine
GEF	GTPase exchange factors
GHRH	
GIP	peptide insulinoïde dépendant du glucose
GIPR	récepteur pour le GIP
GR	récepteurs aux glucocorticoïdes
GRE	élément de réponse pour le récepteur aux glucocorticoïdes
GRK	G protein-coupled receptor kinase
gwpGL-3 Basic	vecteur pGL-3 Basic transformé gateway
HDAC	désacétylase d'histones
hGIPR	GIPR humain
HRP	peroxydase de Raifort
IGF-I	facteur de croissance à l'insuline I
IGF-II	facteur de croissance à l'insuline II
JNK	Jun N-terminal kinase
kb	kilobase
KCl	chlorure de potassium
LDL	lipoprotéine de faible densité
LH	hormone lutéinisante
MAPK	kinase induite par les mitogènes
MBP	protéine de liaison à l'ADN méthylée
MC2R	récepteur de l'ACTH
MEK	MAPK kinase
MEKK	MEK kinase
MgCl ₂	dichlorure de magnésium

MR	récepteurs aux minéralocorticoïdes
NaCl	chlorure de sodium
nCaRE	élément de régulation négative par le calcium
p90RSK	90 kDa ribosomal S6 kinase
pb	paire de bases
PI3K	phosphatidyl inositol-3 kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PMSF	fluorure de méthylsulfonate
PPNAD	dysplasie micronodulaire bilatérale
PTH	parathormone
RGS	regulator of G protein signaling
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
SAPK	kinase induite par le stress
SC	syndrome de Cushing
SMRT	silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
SNS	système nerveux sympathique
StAR	protéine de régulation aiguë des stéroïdes
TAFs	TBP-associated factors
TBP	protéines de liaison de la boîte TATA
TF _{II} D	Transcription factor _{II} D
TIEG	TGFβ-inducible early protein gene
TSH	thyroid stimulating hormone
VIP	peptide intestinal vasoactif

CHAPITRE 1

INTRODUCTION



1. Introduction

1.1 Les glandes surrénales

La petite taille et l'emplacement des deux glandes surrénales, bien ancrées à la surface de chaque rein, ont conduit de nombreux observateurs à travers les âges à ignorer leur présence. Le premier anatomiste à donner une description détaillée des deux glandes surrénales fut Bartholomes Eustachis (1520 – 1574) en 1563 (Eustachi B, 1563). Cependant, le débat entourant leur fonction durera près de trois cents ans (Leonard A, 1951). Le crédit pour la première observation des glandes surrénales au microscope revient à Rudolph Albert Von Kölliker (1817 – 1905) qui publie en 1852 une description complète de leur structure, description qui a peu changé depuis. Toutefois, l'apport le plus remarquable de Von Kölliker à l'Histoire fut probablement son analyse de la fonction surrénalienne, qu'il divise pour la première fois entre cortex et médulla (Von Kölliker RA, 1852). Nombreux seront ensuite les scientifiques qui contribueront à une meilleure compréhension des glandes surrénales (Carmichael SW).

Chez les mammifères, les glandes surrénales sont deux glandes endocrines triangulaires d'environ quatre à six grammes qui sont situées au-dessus de chaque rein. La surface de chacune des glandes est enveloppée par une capsule conjonctive faite de fibroblastes et de fibres de collagène puis est revêtue d'une couche de tissu adipeux ce qui lui donne sa couleur jaunâtre.

Bien que ses fonctions soient semblables chez toutes les espèces, le développement de la surrénale diffère légèrement selon celles-ci. Chez l'humain, la surrénale est composée de deux régions d'origine embryonnaire distincte, la médulla et le cortex, qui sécrètent des hormones de nature très différente. Alors que le cortex est issu de l'épithélium coelémique (mésoderme), la médulla émane de la crête neurale (ectoderme). Ces deux régions vont fusionner vers la huitième semaine de gestation pour former la surrénale fœtale. Le cortex fœtal est alors composé de deux zones, la zone fœtale et la zone

définitive, qui vont se développer et se différencier sous l'action de l'ACTH produite par l'hypophyse fœtale (Pepe GJ et Albrecht ED 1990 ; Mesiano S et Jaffe RB 1997).

Chez l'embryon, la zone fœtale est beaucoup plus volumineuse que ne l'est la surrénale adulte elle-même. Elle est formée de cellules éosinophiles et produit de grandes quantités d'androgènes qui serviront de précurseurs pour la synthèse des oestrogènes par le placenta. La zone fœtale va progressivement se transformer en zone définitive et perdre jusqu'au 2/3 de sa masse durant la gestation. Chez le fœtus, des îlots de cellules chromaffines sont répartis à travers la zone fœtale, mais la médulla apparaîtra uniquement lors de la régression de la zone fœtale par apoptose. À ce moment, les cellules chromaffines pourront migrer autour de la veine centrale pour former une médulla rudimentaire qui va évoluer pour prendre son apparence finale vers l'âge de douze mois. Durant la vie fœtale, les cellules chromaffines sécrètent déjà de la noradrénaline, alors que la synthèse de l'adrénaline est initiée juste avant la naissance (Pepe GJ et Albrecht ED 1990 ; Mesiano S et Jaffe RB 1997).

La zone définitive est formée de cellules basophiles qui possèdent toutes les caractéristiques de cellules en voie de différenciation (petit cytoplasme, nombreux ribosomes libres et petites mitochondries denses). Les cellules de la zone définitive vont se différencier en cellules productrices de stéroïdes et commencer à accumuler des lipides durant la vie fœtale. Durant cette même période, les cellules de la zone définitive vont également se différencier en trois zones distinctes qui formeront les trois zones du cortex surrénalien adulte. Ce processus s'amorce par la formation de la zone fasciculée puis, la zone glomérulée commencera à apparaître. Celle-ci ne sera toutefois complètement formée qu'à la naissance. Quant à la zone réticulée, elle n'apparaîtra que plus tard durant l'enfance (Pepe GJ et Albrecht ED 1990 ; Mesiano S et Jaffe RB 1997).

La surrénale fœtale produit principalement de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfate, le sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA-S), deux hormones dont la concentration va graduellement diminuer au cours du développement, parallèlement à la régression de la zone fœtale. Du cortisol est également produit en très petites quantités par les surrénales fœtales. Cependant, le cortisol essentiel à la maturation normale de certains organes provient principalement de la mère ou est synthétisé à partir de la progestérone placentaire (Pepe GJ et Albrecht ED 1990 ; Mesiano S et Jaffe RB 1997).

À l'âge adulte, les surrénales sont très vascularisées. Elles sont irriguées par trois artères principales qui s'organisent en un important réseau capsulaire, cortical puis médullaire. L'artère supérieure provient d'une dérivation de l'artère phrénique, l'artère médiane de l'aorte et l'artère inférieure de l'artère rénale. Le sang est ensuite drainé à l'extérieur de la surrénale par l'intermédiaire de la veine surrénalienne. La veine surrénalienne droite se jette directement dans la veine cave alors que la veine surrénalienne gauche passe par la veine rénale (Gagnon R, 1956 ; Gagnon R, 1957 ; Dobbie et al., 1966) (Figure 1,1).

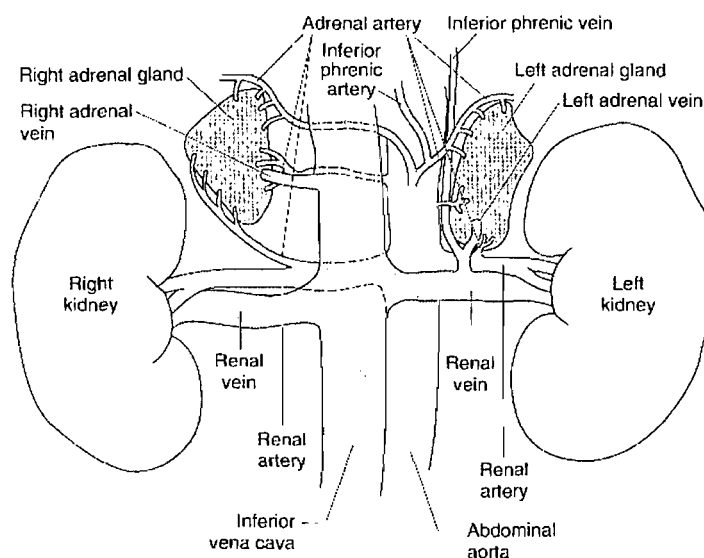


Figure 1,1. Anatomie des glandes surrénales (Francis S Greenspan et Gordon J Strewler, 1997).

1.1.1 La médulla

La médulla, rougeâtre, est la partie interne de la glande surrénale. À l'âge adulte, elle représente environ 20 % de sa masse. La médulla est formée de cellules chromaffines (phéochromocytes), de larges cellules ovoïdes arrangées en cordons autour des vaisseaux sanguins qui la traversent. Les phéochromocytes possèdent un large noyau, un golgi très développé et de larges vésicules qui renferment les catécholamines (épinéphrines et norépinéphrine), les principales hormones produites dans cette zone.

La médulla fait partie du système nerveux sympathique (SNS). Cependant, contrairement aux autres organes et tissus qui composent ce système, et qui sécrètent uniquement la norépinéphrine, la médulla est principalement sollicitée lors d'un déséquilibre homéostatique en raison de sa capacité à produire de l'épinéphrine. Lors d'un stress intense, l'organisme répond par toute une série de réactions, dont la stimulation des centres orthosympathiques de la moelle épinière par l'hypothalamus. La stimulation nerveuse de la médulla par les neurones sympathiques cholinergiques préganglionnaires entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique suivie d'une entrée de calcium dans la cellule qui libère la norépinéphrine et l'épinéphrine.

Le précurseur des catécholamines, la tyrosine, entre dans les phéochromocytes par transport actif et est immédiatement métabolisé en dihydroxyphénylalanine (dopa) par la tyrosine hydroxylase (Figure 1,2). La dopa est ensuite convertie en dopamine par la dopa décarboxylase puis en norépinéphrine par la dopamine β -hydroxylase. La norépinéphrine peut être directement emmagasinée dans des vésicules, mais dans certaines cellules elle est transformée en épinéphrine par la phényléthanolamine-N-méthyltransférase (PNMT) puis emmagasinée dans des vésicules jusqu'à son utilisation (Greenspan FS et Strewler GJ, 1997). Chez les mammifères, la PNMT est induite par le cortisol et les phéochromocytes qui contiennent de l'épinéphrine sont directement alimentés par les capillaires en

provenance du cortex, ce qui permet une stimulation directe. Les autres cellules de la médulla sont alimentées par les artères.

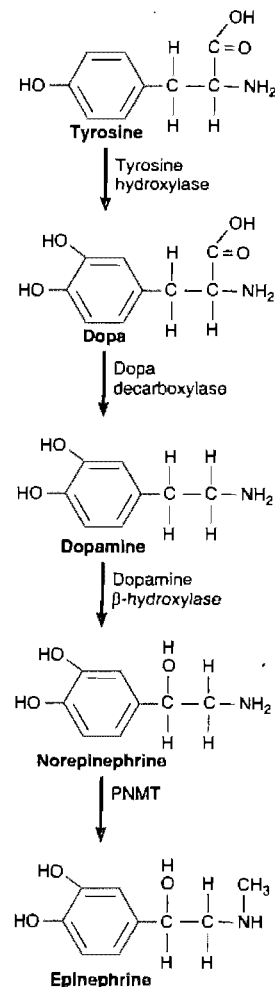


Figure 1,2. Synthèse des catécholamines (Francis S Greenspan et Gordon J Strewler, 1997).

L'action des catécholamines est de courte durée et plusieurs mécanismes sont impliqués dans leur inactivation (Figure 1,3). Les catécholamines peuvent être captées par les neurones dont elles sont issues pour être catabolisées en acide dihydroxymandélique (DHMA) par la monoamine oxydase (MAO). La capture des catécholamines peut également se faire par des cellules non neuronales, principalement dans le foie et le rein. Dans ces cellules, les catécholamines sont inactivées par la catéchol-o-méthyltransférase (COMT) qui méthyle un des

groupements hydroxyle pour former la métanéphrine et la normétanéphrine. Ces deux dérivés o-méthyle peuvent également subir une hydroxylation du groupe méthylamine par la MAO pour former l'acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique. La COMT peut également métaboliser la DHMA en acide 3-méthoxy-4-hydroxymandélique. Dans le foie, le système digestif et les érythrocytes, l'épinéphrine et la norépinéphrine peuvent également être inactivées par conjugaison avec un groupe sulfate ou glucuronide.

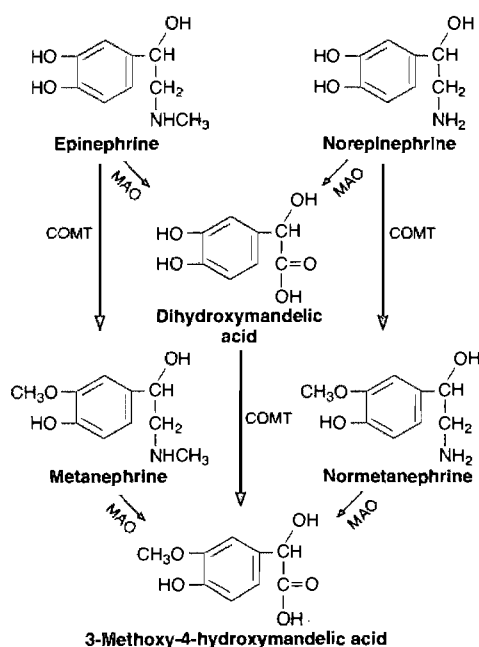


Figure 1,3. Catabolisme des catécholamines (Francis S Greenspan et Gordon J Stewler, 1997).

Les catécholamines influent sur un large éventail de réponses biologiques grâce à la variété de récepteurs auxquels elles sont capables de se lier. Les récepteurs qui lient les catécholamines sont appelés récepteurs adrénergiques et se divisent en deux classes (α et β), elles-mêmes formées de plusieurs sous-types (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 et β_3). Chaque récepteur lie l'épinéphrine et la norépinéphrine avec sa propre affinité et induit une voie de signalisation spécifique. Les récepteurs β sont couplés positivement à la voie de l'AMPc ($G_{\alpha s}$) alors que les récepteurs α_1 activent la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la G_q . Les récepteurs

α_2 sont couplés négativement à la voie de l'AMPc (G_{ai}). Cette diversité permet à chaque cellule de répondre de manière distincte selon le ou les récepteurs qui sont exprimés à sa surface. De manière générale, les récepteurs α ont un effet stimulant alors que les récepteurs β agissent plutôt comme relaxant.

Les récepteurs adrénergiques sont impliqués dans un large éventail de réponses biologiques. De manière générale, les catécholamines intensifient la consommation d'oxygène ainsi que la production de chaleur et influencent l'excrétion d'eau et d'ions (sodium, potassium, calcium et phosphate) par les reins. La fonction des catécholamines au niveau du système cardiovasculaire est également importante. L'épinéphrine se comporte comme un stimulant sur le rythme cardiaque sans toutefois affecter la pression artérielle moyenne puisque son effet sur la pression systolique (active) s'oppose à celui exercé sur la pression diastolique (inhibe). À l'inverse, la norépinéphrine réduit le rythme cardiaque et augmente la pression artérielle moyenne. De la même façon, les catécholamines influencent la relaxation et / ou la contraction du tissu musculaire lisse non vasculaire. L'épinéphrine atténue la motilité gastro-intestinale et agit comme bronchodilatateur alors que la norépinéphrine n'a pas d'effet sur les muscles intestinaux et bronchiques. Les catécholamines jouent aussi un rôle dans la dilatation des pupilles et agissent sur la trachée et l'utérus. Finalement, l'activité métabolique peut être affectée par les catécholamines. Par exemple, l'épinéphrine a un rôle hyperglycémiant temporaire par l'intermédiaire de la glycogénolyse hépatique. Elle accentue également la concentration sanguine d'acides gras libres en stimulant la lipolyse dans le tissu adipeux. La norépinéphrine n'a pas d'effet sur le catabolisme du glycogène, mais son action sur la lipolyse est plus puissante que celle de l'épinéphrine.

Les cellules chromaffines sécrètent aussi de nombreux peptides dont la met- et la leu-enképhaline, l'adrénomédulline, la corticolibérine (CRH), le facteur de relâche de l'hormone de croissance (GHRH), la somatostatine, et le peptide histidine méthionine, mais l'effet de ceux-ci est surtout observé lors du

développement de pathologies de la médullosurrénale et leur signification physiologique est généralement inconnue.

La principale pathologie associée à la médulla est le phéochromocytome, une tumeur sécrétant principalement des catécholamines et provoquant l'hypertension artérielle. Toutefois, certains phéochromocytomes produisent aussi un large éventail d'hormones (somatostatine, substance P, corticolibérine, hormone adrénocorticotrope, β -endorphine, lipotropine, peptide intestinal vasoactif, interleukine-6, hormone parathyroïdienne, neuropeptide Y, calcitonine, met-enképhaline, sérotonine, gastrine, neurotensine, pancréastatine) qui peuvent aussi contribuer à certains symptômes particuliers. Les phéochromocytomes peuvent être présents sous forme de tumeur isolée ou être associés à d'autres néoplasies endocriniennes comme c'est le cas dans le syndrome de néoplasies endocriniennes multiples de type 2 (MEN-2).

L'insuffisance medullosurrénalienne survient généralement suite à une surrénalectomie. L'insuffisance autonome de la médulla est rare et entraîne rarement des symptômes cliniques. Dans certains cas cependant le retour à la glycémie normale suite à une hypoglycémie peut être plus lent et une hyotension artérielle peut être observée.

1.1.2 Le cortex

Le cortex représente environ 80 % de la masse de la glande surrénale adulte. Les cellules du cortex (adrénocytes) sont organisées en chapelets, séparés par des cavités sinusoïdales, et possèdent toutes les caractéristiques des cellules productrices de stéroïdes. Entre autres, elles contiennent de fines gouttelettes lipidiques, appelées liposomes, qui sont formées de cholestérol, précurseur de toutes les hormones stéroïdiennes. Les adrénocytes sont également riches en mitochondries et en réticulum endoplasmique lisse, siège de la stéroïdogenèse.

Le cortex est divisé en trois zones (Figure 1,4) dont les cellules spécifiques assurent une sécrétion hormonale particulière (NussDorfer CG, 1986 ; Vinson GP, 2003). Cependant, les adrénocytes sont en migration continue ce qui implique que leur capacité sécrétoire, de même que les gènes qu'ils expriment, changent au cours de leur transition de la zone glomérulée, où elles sont issues, vers la zone réticulée, où elles subissent l'apoptose. La zone externe, recouverte d'une capsule et de graisse, est la zone glomérulée. Elle forme environ 10 % du volume du cortex et est responsable de la production des minéralocorticoïdes. Dans la zone glomérulée, les cellules sont associées en bourgeons plus ou moins bien définis. Ces cellules possèdent de petites mitochondries allongées et beaucoup de réticulum endoplasmique lisse, mais peu de lysosomes, de granules de lipofuscine et de microvilli. La zone médiane, la zone fasciculée, représente environ 75 % du cortex surrénalien. Elle est impliquée dans la synthèse des glucocorticoïdes. Les cellules de la zone fasciculée sont plus volumineuses que les cellules des zones glomérulée et réticulée et forment des cordons cellulaires parallèles disposés de façon radiale par rapport à la médulla. Ces cordons cellulaires sont séparés par les capillaires droits du cortex. Les cellules de cette zone sont riches en mitochondries sphériques et en réticulum endoplasmique lisse. Elles contiennent aussi des inclusions de lipides abondantes, de nombreuses granules de lipofuscine et des microvilli proéminents. La zone interne, la zone réticulée, est en contact avec la médulla. Elle est formée d'un réseau de cellules en filets croisés et de capillaires interdigités. L'observation microscopique permet de distinguer deux types cellulaires dans la zone réticulée. Le premier est acidophile et très compact alors que le second, les cellules claires, l'est beaucoup moins. Les cellules de la zone réticulée sont bien pourvues en mitochondries, mais pauvres en réticulum endoplasmique lisse et en gouttelettes lipidiques. La présence des lysosomes est cependant accrue et les granules de lipofuscine sont plus grosses que dans les deux autres zones.

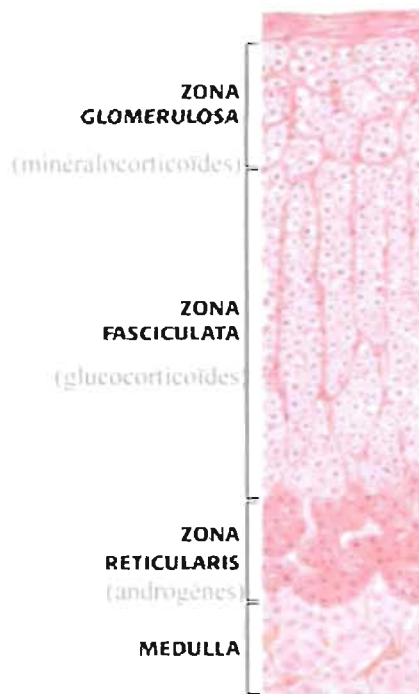


Figure 1,4. Histologie des glandes surrénales (Lacroix et al., 2004).

Dans toutes les zones du cortex, les contacts entre les cellules se font par l'intermédiaire de desmosomes, mais les cellules des zones fasciculée et réticulée communiquent aussi grâce à des jonctions serrées.

1.1.3 Les hormones stéroïdiennes

L'expression d'enzymes particulières dans les zones glomérulée, fasciculée et réticulée permet de produire des hormones spécifiques à chaque zone. Le cholestérol nécessaire à la synthèse des hormones stéroïdiennes provient des chylomicrons et des lipoprotéines de faibles densités présents dans la circulation sanguine. Il est emmagasiné dans la cellule sous forme d'esther de cholestérol. Ainsi, dans toutes les cellules du cortex surrénalien, la production des hormones stéroïdiennes commence par le transport des esthers de cholestérol à la membrane mitochondriale interne par la protéine StAR. Les esthers de cholestérol sont ensuite transformés en cholestérol libre par l'hydroxylase des

esther de cholestérol. Dans la mitochondrie, la transformation du cholestérol en prégnénolone par la P450scc est également commune à toutes les cellules et représente l'étape limitante de la stéroïdogénèse (Hanukoglu I, 1992). Cette transformation comprend trois monooxygénations consécutives ($\text{Steroid-H} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{Steroid-OH} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$) et le bris du lien C-20,22 (Figure 1,5). Cette réaction consomme deux électrons qui sont transférés à partir de la NADPH par l'adrénodoxine (Adx). La prégnénolone est ensuite transportée vers le réticulum endoplasmique lisse où sa modification ultérieure déterminera la variété d'hormones produites.

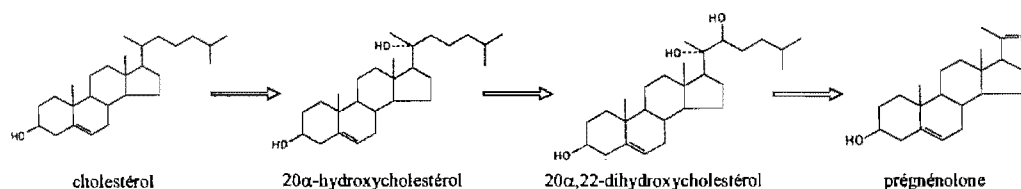


Figure 1,5. Conversion du cholestérol en prégnénolone.

1.1.3.1 Les minéralocorticoïdes

La zone glomérulée est le siège de la production des minéralocorticoïdes, dont le plus important est l'aldostérone (Figure 1,6). Cette zone du cortex surrénalien exprime la 3β-HSD qui permet de convertir la prégnénolone en progestérone, mais pas la P450c17, enzyme essentielle à la voie de synthèse du cortisol et des androgènes surrénaliens. La progestérone est ensuite convertie en 11-déoxycorticostérone par la P450c21 puis en corticostérone par la P450c11. La dernière étape permet la transformation de la corticostérone en aldostérone grâce à l'aldostérone synthase (P450c18).

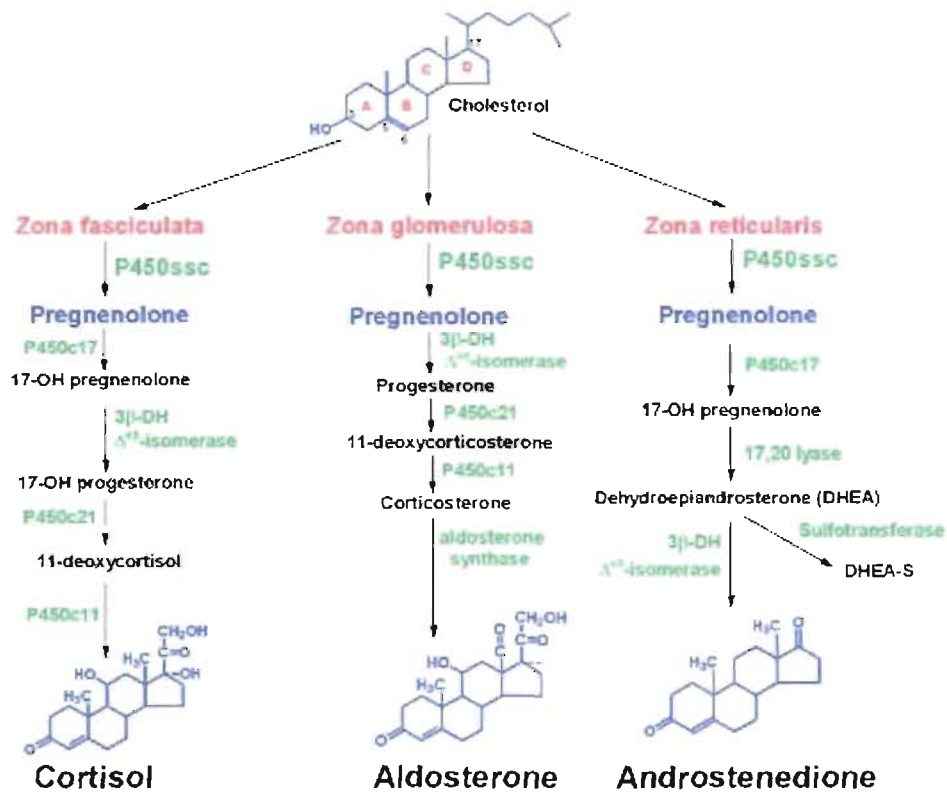


Figure 1,6. Synthèse des hormones stéroïdiennes corticosurrénales (Francis S Greenspan et Gordon J Stewler, 1997).

L'aldostérone accélère la réabsorption des ions sodium (Na^+) principalement par l'intermédiaire des tubules rénaux, mais également par la muqueuse gastro-intestinale. Elle a aussi un effet sur les glandes sudoripares et salivaires. La réabsorption de Na^+ entraîne une rétention des fluides par le tube contourné distal et le tube collecteur du rein, ce qui provoque une augmentation de la pression artérielle. De par son effet sur la réabsorption de Na^+ par les tubules rénaux, l'aldostérone affecte également la concentration plasmatique d'ions potassium (K^+) et d'ions hydrogène (H^+) puisque l'équilibre Na^+/K^+ est maintenu à l'aide d'une pompe Na^+/K^+ ATPase. Les ions H^+ sont excrétés par les tubules rénaux afin de maintenir l'équilibre ionique. Dans le cerveau, l'aldostérone stimule la sécrétion de l'hormone anti-diurétique (ADH) par la neurohypophyse ce qui contribue à la réabsorption d'eau.

Le contrôle de la sécrétion d'aldostérone se fait principalement par le système rénine - angiotensine. Lorsque le volume plasmatique diminue, la réduction du débit sanguin rénal est détectée par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire qui jouent le rôle de barorécepteurs. L'organisme réagit à cette réduction de pression en stimulant la sécrétion de la rénine, une enzyme protéolytique qui coupe le lien peptidique devant les acides aminés leucine qui sont suivis d'une valine. L'augmentation de l'osmolarité a également pour conséquence de favoriser la relâche de la rénine. L'osmolarité des fluides est détectée par des cellules spécialisées du rein, situées à proximité des cellules de type barorécepteur. Ces cellules agissent à la manière d'un chémorécepteur et détectent tout changement dans le niveau d'ions circulants. Lorsqu'une hausse de l'osmolarité est détectée, le système rénine-angiotensine est activé.

La relâche de la rénine est responsable de la transformation de l'angiotensinogène en angiotensine I (Ang I), lui-même clivé en angiotensine II (Ang II) par une dipeptidylcarboxypeptidase, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (Figure 1,7). Une fois produite, l'Ang II est capable de se lier à son récepteur (AT-1) présent à la surface des cellules de la zone glomérulée. Cette interaction provoque une activation rapide de la phospholipase C (PLC) et une augmentation de la production d'inositol triphosphate (IP₃). La réponse métabolique qui suit (relâche des réserves de calcium du réticulum endoplasmique) entraîne la production d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée (Catt et al., 1987). L'Ang II peut aussi agir directement sur les artérioles périphériques et sur vitesse de filtration glomérulaire. La voie de la phospholipase C est donc principalement associée aux effets vasoconstricteurs et à la rétention des fluides. Le récepteur AT-1 est également couplé à la voie des tyrosines kinase et à l'activation des MAPK kinase, une voie principalement impliquée dans la transcription des gènes qui induisent la prolifération cellulaire.

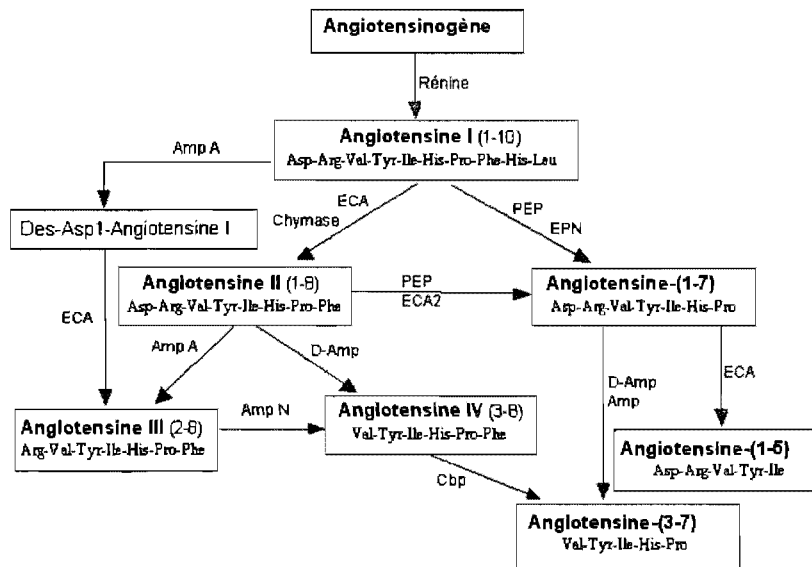


Figure 1,7. Métabolisme de l'angiotensine.

Par ailleurs, la rénine n'est pas le seul signal qui conduit à la relâche de l'aldostérone. L'augmentation des niveaux circulants de potassium a également cet effet. En plus de son action sur l'osmolarité, le K^+ agit directement sur les cellules de la zone glomérulée en favorisant l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}). L'ACTH est aussi capable de stimuler la sécrétion d'aldostérone en favorisant l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse. La zone glomérulée n'est cependant pas la cible principale de l'ACTH qui ne joue ici qu'un rôle très limité.

L'angiotensine II, dont la demi-vie est d'environ une minute, peut être convertie en angiotensine III (Ang III) par une aminopeptidase de type A ou en angiotensine-[1-7] (Ang-[1-7]) par un homologue de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE2). L'Ang III fixe le récepteur AT-1 avec la même affinité que l'Ang II et produit les mêmes effets alors que l'Ang-[1-7] a un effet hypotenseur. L'Ang IV, produit par une aminopeptidase de type N à partir de l'Ang III, joue aussi un rôle hypotenseur. Finalement, les produits de

dégradation finale, l'angiotensine-[1-5] et l'angiotensine-[3-7] sont inactifs (Figure 1,7).

Le métabolisme de l'angiotensine n'est pas le seul à exercer une action répressive importante sur le système rénine - angiotensine. L'Ang II agit également sur la relâche de la rénine par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. De plus, la diminution de l'osmolarité, l'augmentation du volume plasmatique, de même que la sécrétion du facteur natriurétique (ANP) en réponse à la hausse de la pression artérielle, inhibent la libération de rénine (Ehrhart-Bornstein et al., 1998).

L'hyperaldostéronisme est principalement causé par la présence d'un adénome corticosurrénalien et provoque une hypertension artérielle ainsi que le développement d'œdème et une perte d'ions K^+ susceptible d'entraîner un affaiblissement musculaire. L'insuffisance en minéralocorticoïdes est généralement conjuguée à une déficience en glucocorticoïdes, situation connue sous le nom de maladie d'Addison et dont le traitement consiste à administrer des corticostéroïdes de substitution à doses physiologiques.

1.1.3.2 Les glucocorticoïdes

La zone fasciculée est responsable de la synthèse des glucocorticoïdes. Chez l'humain, le cortisol est le glucocorticoïde le plus important. Contrairement à la zone glomérulée, la zone fasciculée exprime la P450c17. Dans cette zone, la prégnénolone peut donc être convertie en 17α -hydroxyprégnénolone, le précurseur de la voie de synthèse du cortisol. En contrepartie, la zone fasciculée n'exprime pas l'aldostérone synthase ce qui explique que cette zone ne produit pas d'aldostérone.

Les glucocorticoïdes ont un effet marqué sur de nombreuses réponses métaboliques. Bien que l'insuline et le glucagon soient les principales hormones impliquées dans la régulation du métabolisme du glucose, le cortisol a

également un effet hyperglycémiant. Il stimule la gluconéogenèse dans les hépatocytes, diminue le transport du glucose dans les cellules et exerce un rôle permissif qui avive l'action de l'épinéphrine sur le métabolisme du glucose. Combinés, ces effets du cortisol sont responsables de l'intolérance au glucose provoquée par un taux élevé de cortisol. Cependant, en physiologie normale, les glucocorticoïdes sont surtout utiles pour mobiliser les réserves de glucose et préparer l'organisme à répondre à un stress.

Dans les muscles squelettiques et dans le tissu adipeux, le cortisol stimule la protéolyse et la lipolyse respectivement. Les acides aminés et les acides gras produits servent ensuite à la synthèse du glucose par le foie. À haute concentration, les glucocorticoïdes induisent cependant la lipogenèse et contribuent à l'accumulation des graisses observée dans la pathologie du syndrome de Cushing (Section 1,2) alors que le catabolisme des protéines est responsable de l'atrophie musculaire chez ces patients.

La concentration de cortisol plasmatique influence aussi le métabolisme osseux. À faible concentration, les glucocorticoïdes augmentent l'expression du récepteur à la parathormone (PTH). La PTH favorise la réabsorption du calcium par le tractus gastro-intestinal ainsi que par les tubules contournés distaux du rein et stimule l'activation de la vitamine D, ce qui contribue au maintien d'une bonne santé osseuse. Cependant, lorsque sa concentration dans le sang est élevée, le cortisol est impliqué dans la résorption de la masse osseuse et dans le développement de l'ostéoporose en augmentant le catabolisme et en diminuant la synthèse du collagène. Cet effet du cortisol entraîne aussi un affaiblissement de la peau ce qui accroît les risques d'ecchymoses.

Le rôle des glucocorticoïdes sur le système immunitaire est complexe. Entre autres, le cortisol est impliqué dans une atténuation de la réponse inflammatoire en raison de sa capacité à abaisser le nombre de cellules basophiles, qui sont

responsables de la réponse allergique. Le cortisol abaisse également le nombre de lymphocytes dans le sang, cellules qui sont impliquées dans la reconnaissance d'un antigène spécifique, de même que la production des anticorps. De plus, le cortisol inhibe la relâche des kinines, un peptide qui aide à la perméabilisation des capillaires et permet la migration des leucocytes. Le cortisol diminue aussi le nombre de cellules éosinophiles, des cellules spécialisées dans la réponse aux infections parasitaires. L'effet immunosuppresseur du cortisol est fortement utilisé en thérapeutique. Cependant, ses nombreuses actions au niveau du système immunitaire affaiblissent les défenses de l'organisme ce qui le rend sensible aux infections.

À faible dose, les glucocorticoïdes contribuent au maintien normal de la pression artérielle. Cependant, en période de stress il contribue à l'augmentation de la pression artérielle moyenne (systolique et diastolique) en raison de son effet sur la sensibilisation des artéριοles à l'action de la norépinéphrine. Les glucocorticoïdes ont également un effet sur le comportement (fatigue, perte de sommeil, anxiété, dépression). Bien que les mécanismes exacts ne soient pas encore pleinement élucidés, une altération de l'excitabilité et de la perception sensorielle, de même qu'une modification de l'action des neurotransmetteurs qui contrôlent la synthèse et la sécrétion de la sérotonine sont probablement impliquées dans cet effet.

Chez le fœtus, les glucocorticoïdes sont importants pour la maturation de certains organes. La production de surfactant par les cellules alvéolaires pulmonaires, de même que la production des enzymes hépatiques sont dépendantes du cortisol, qui est aussi impliqué dans le développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Le cortisol joue également un rôle dans les changements placentaires qui surviennent durant la gestation et dans l'initiation des changements hormonaux qui conduisent à la parturition. Chez l'enfant, un taux élevé de cortisol diminue le niveau de l'hormone de croissance ce qui contribue aux retards de croissance.

La réponse aux glucocorticoïdes est médiée par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), mais également par le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR). Étonnamment, les glucocorticoïdes ont une plus grande affinité pour le MR que le GR. À faible concentration, ce sont les MR qui sont responsables des effets des glucocorticoïdes. Puis, lorsque leur niveau dans le sang augmente, les MR sont saturés et les GR commencent à être occupés. Cet effet est observé, entre autres, le matin au réveil. Finalement, lors d'un stress intense, les GR sont saturés à leur tour ce qui entraîne d'autres réponses physiologiques. Le fait que les glucocorticoïdes lient différemment les MR et les GR selon leur concentration explique en partie pourquoi la réponse à un faible niveau de glucocorticoïdes est parfois contraire à celle observée à une plus haute concentration. Bien que les glucocorticoïdes aient une meilleure affinité pour le MR que pour le GR et que le cortisol soit en quantité plus importante que l'aldostérone dans le sang, cette dernière demeure le minéralocorticoïde le plus important. Les cellules cibles des minéralocorticoïdes sont protégées de l'action des glucocorticoïdes grâce à la 11 β -déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2), qui convertit le cortisol en une forme inactive, la cortisone. Cependant, lorsque le niveau de cortisol est très élevé, comme c'est le cas chez les patients souffrant du syndrome de Cushing, la 11 β -HSD2 est saturée et l'effet minéralocorticoïde du cortisol sur ces tissus se fait sentir.

La production de glucocorticoïdes par la zone fasciculée et le maintien de son intégrité tissulaire sont principalement dépendants de la corticotrophine (ACTH). L'ACTH, une hormone peptidique de 39 acides aminés, est sécrétée par les cellules corticotropes de l'hypophyse, une petite glande bilobale. Le lobe antérieur (adénohypophyse) est caractérisé par son système vasculaire et est constitué de cinq types cellulaires spécialisés dans la sécrétion d'hormones uniques (Tableau 1,1) et de cellules non sécrétrices alors que le lobe postérieur (neurohypophyse) reçoit de nombreuses fibres en provenance de l'hypothalamus.

Tableau 1,1. Synthèse hormonale par l'adénohypophyse.

CELLULES	HORMONE
CORTICOTROPE	corticotrophine (ACTH)
SOMATOTROPE	hormone de croissance (GH)
GONADOTROPE	hormones lutéinisante (LH) et folliculostimulante (FSH)
THYRÉOTROPE	thyrotropine (TSH)
LACTOTROPE	prolactine (PRL)

La réponse à l'ACTH est médiée par un récepteur couplé aux protéines G, le MC2 (Mountjoy et al., 1992 ; Naville et al., 1997 ; Clark et al., 2003), principalement exprimé à la surface des cellules corticosurréaliennes. La liaison de l'ACTH à son récepteur active principalement la voie de l'AMPc, par l'intermédiaire de la protéine G α s. À court terme la PKA, dont l'activité est stimulée par une élévation du niveau d'AMPc, phosphoryle les hormones de la stéroïdogénèse telle que la protéine StAR, la P450scc, la P450c17 et la 3 β -HSD (Waterman MR et Bischof LJ, 1996 ; Lehoux et al., 1998) ce qui permet d'activer rapidement la synthèse des stéroïdes (Figure 1,8). À plus long terme, la PKA régule l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse grâce à son action directe sur des facteurs de transcription généraux (CREB, Sp1) et spécifiques (Pbx-1, Nur77 et SF-1), de même que par l'activation d'une phosphatase nécessaire à l'action d'une seconde catégorie de facteurs de transcription (Sewer MB et Waterman MR, 2002). Le maintien de l'intégrité tissulaire des zones fasciculée et réticulée fait aussi partie intégrante de la réponse tardive. L'ACTH stimule la production de facteurs de croissance, dont l'IGF-II et le TGF- β , qui favorisent la prolifération des adrénocytes, ce qui provoque une augmentation de la taille, mais aussi du nombre de cellules. Cette action de l'ACTH est responsable de l'hyperplasie corticosurréaliennne observée chez les patients souffrant du syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH (section 1,2). À l'opposé, l'absence d'ACTH entraîne l'apoptose des cellules corticosurréaliennes.

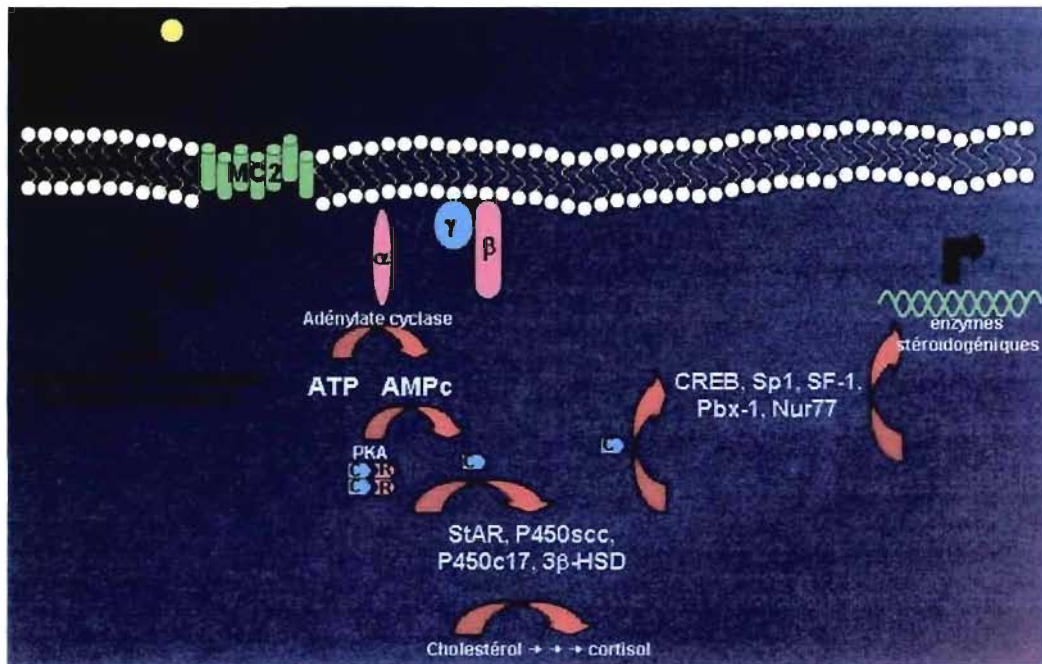


Figure 1,8. ACTH et signalisation intracellulaire

Bien que l'AMPc soit le principal médiateur dans la réponse à l'ACTH, le calcium, la protéine kinase C (PKC), les MAPK (ERK1/2), le potentiel de membrane et le remodelage du cytosquelette peuvent aussi jouer un rôle.

La relâche de l'ACTH est elle-même sous le contrôle de la corticolibérine (CRF), un peptide de 44 acides aminés synthétisé dans les noyaux des neurones paraventriculaire de l'hypothalamus (Vale et al., 1983). L'hypothalamus est une zone du cerveau comprenant plusieurs noyaux de neurones qui sont en contact avec la neurohypophyse (Figure 1,9). Le contact entre l'hypothalamus et l'adénohypophyse se fait par le système porte.

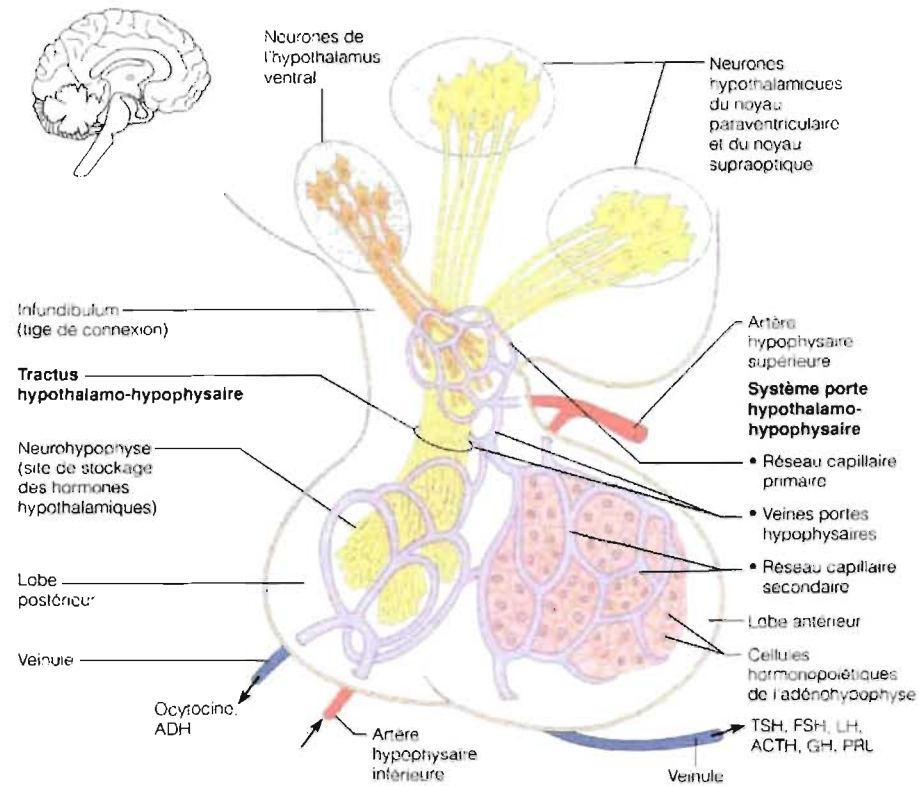


Figure 1,9. Anatomie de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Élaine N. Marieb, 1999).

À la surface des cellules corticotropes, le CRF lie son récepteur (Chen FM et al., 1986 ; Chen R et al., 1993), ce qui entraîne la synthèse et la maturation du peptide POMC, le précurseur de l'ACTH (Figure 1,10). Le POMC donne également naissance à d'autres peptides dont l' α -MSH, qui contribue à la pigmentation de la peau. L'action du CRF est sensibilisée par l'arginine vasopressine (AVP) qui lie également un récepteur couplé aux protéines G (V_3) à la surface des cellules corticotropes (de Keyzer et al., 1994). Ce peptide est aussi synthétisé dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus.

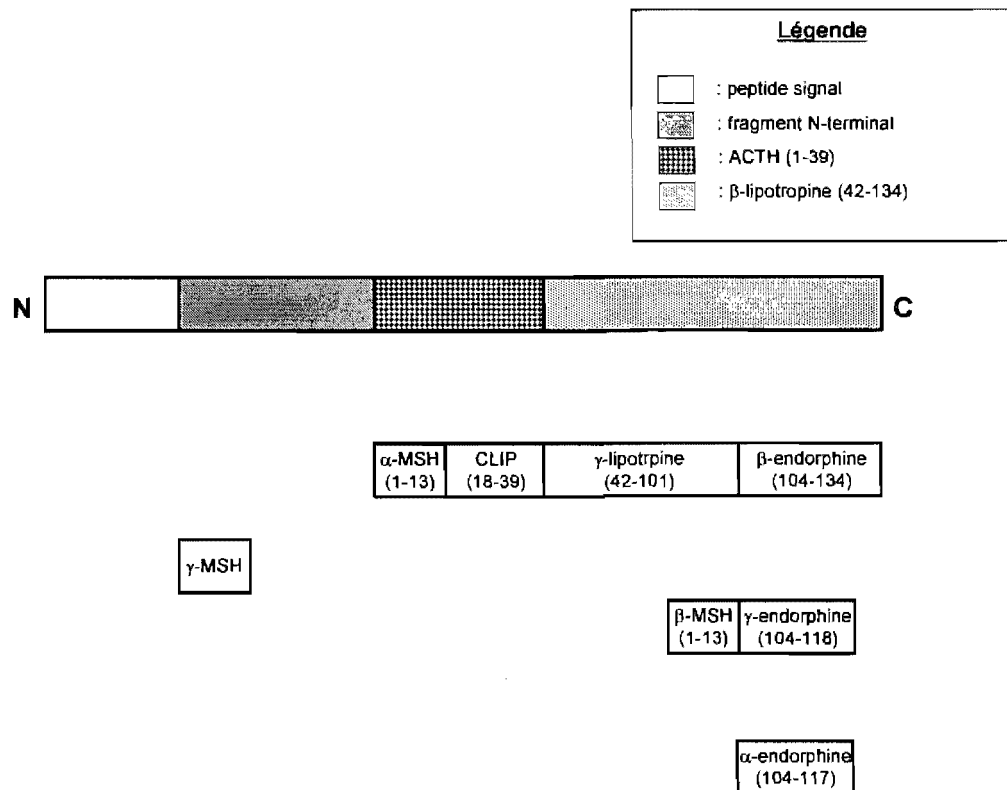


Figure 1,10. Synthèse de l'ACTH à partir de son précurseur, le POMC.

La sécrétion de cortisol par les cellules de la zone fasciculée suit un rythme circadien dont le pic est atteint le matin à la fin de la période de sommeil. Cependant, le stress (exercice intense, froid, traumatisme, douleur, détresse émotionnelle) peut également augmenter le cortisol plasmatique. La relâche de l'ACTH suit un rythme circadien similaire à celui du cortisol. Toutefois, le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif sur la production de CRF (Bilezikjian LM et Vale WW, 1993) et d'ACTH ce qui prévient une réponse prolongée et excessive qui serait nocive pour l'organisme (Figure 1,11a).

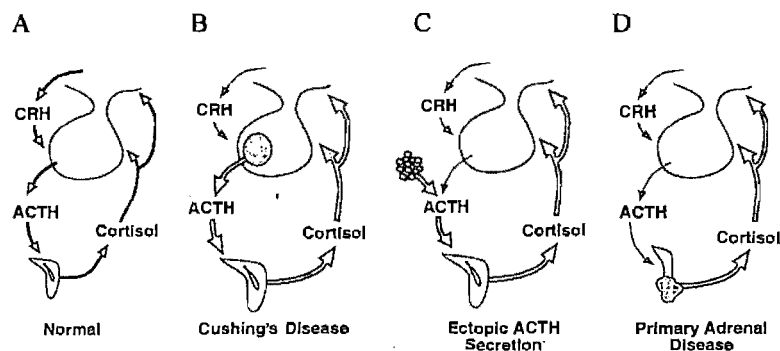


Figure 1,11. Mécanisme de rétrocontrôle du cortisol.

1.1.3.3 Les stéroïdes sexuels

Les stéroïdes sexuels sont principalement produits par les gonades. Cependant, la zone réticulée synthétise également des stéroïdes sexuels faibles sous la forme de déhydroépiandrostérone (DHEA), de sulfate de déhydroépiandrostérone (DHEA-S) et d'androsténédione (Figure 1,6), qui peuvent servir de précurseur à la formation de testostérone. Les androgènes d'origine surrénalienne contribuent à certains changements qui surviennent durant la puberté telle que l'apparition de la pilosité axillaire et pubienne. Après la ménopause, les androgènes surrénaliens servent de substrat pour la production d'œstrogènes à l'extérieur des gonades. Ils jouent également un rôle dans la formation de la masse musculaire et osseuse, la régulation du cholestérol sanguin et le développement gonadique. La synthèse de DHEA dans la zone réticulée commence par la transformation de la prégnénolone en 17-hydroxyprégnénolone, le précurseur de la voie du cortisol. Cependant, dans la zone réticulée, la synthèse d'androgène est possible grâce à la présence de la 17,20 lyase, qui est exprimée uniquement dans cette zone et qui transforme la 17-hydroxyprégnénolone en DHEA. La DHEA peut ensuite être sulfatée par la sulfotransférase (DHEA-S) ou transformée en androsténédione grâce à la 3 β -déshydrogénase (3 β -HSD). Enfin, bien que la zone fasciculée soit responsable de la majeure partie des glucocorticoïdes produits par le cortex surrénalien, la zone réticulée synthétise aussi de faibles doses de cortisol.

1.2 Le syndrome de Cushing

C'est en 1912 que Harvey Cushing décrit pour la première fois le syndrome qui porte aujourd'hui son nom (Cushing H, 1912). Vingt ans plus tard, il émet l'hypothèse qu'une dysfonction hypophysaire puisse être à l'origine de ce syndrome (Cushing H, 1932). Puis, en 1934, le syndrome de Cushing surrénalien et les bienfaits de la résection chirurgicale des tumeurs surrénaliennes furent découverts (Walters W, 1934). Durant les soixante-dix ans qui vont suivre, la compréhension du syndrome de Cushing va s'accroître pour englober la production ectopique d'ACTH et de CRF, de même que la stimulation de la surrénale par des hormones autres que l'ACTH.

Le syndrome de Cushing (Howlett et al., 1985 ; Orth DN, 1995 ; Boscaro et al., 2001) résulte d'une exposition prolongée des tissus à une concentration anormalement élevée de glucocorticoïdes et de stéroïdes sexuels. L'excès de glucocorticoïdes se manifeste par une multitude de symptômes plus ou moins spécifiques tels que l'obésité centrale, l'ostéoporose, l'hypertension artérielle, l'hyperlipidémie, l'atrophie musculaire, l'intolérance au glucose et l'hyperinsulinémie, de même que par des troubles neuropsychiatriques (fatigue, insomnie, anxiété, dépression) et des manifestations dermatologiques (atrophie de la peau, susceptibilité accrue aux ecchymoses, stries abdominales pourpres et hyperpigmentation). L'excès d'androgènes surrénaliens observé dans certaines formes de syndrome de Cushing, provoque l'hirsutisme, l'acné, ainsi que l'aménorrhée chez la femme et l'hypogonadisme chez l'homme en raison de la suppression de l'axe hypophysogonadique. Le large éventail d'action des glucocorticoïdes (section 1.1.2) explique la panoplie de symptômes observés chez les patients et seule l'association de plusieurs de ces altérations combinée aux tests biochimiques permettent un diagnostic précis.

Le plus souvent, le syndrome de Cushing est d'origine exogène et est dû à la prise de glucocorticoïdes de synthèse pour traiter certaines pathologies comme l'asthme, les rhumatismes ou l'arthrite (Quddusi et al., 1998). Le syndrome de

Cushing exogène est temporaire et disparaît lorsque le patient cesse son traitement ou lorsque les doses sont ajustées. Cependant, la modification d'un traitement aux glucocorticoïdes doit se faire progressivement. La prise de glucocorticoïdes exogènes inhibe la synthèse d'ACTH par l'hypophyse, ce qui entraîne l'atrophie des glandes surrénales et cause une insuffisance surrénalienne. Contrairement à ce qui est observé chez les patients dont l'origine du problème est endogène, l'hypertension et les troubles électrolytiques sont généralement évités dans la forme exogène de la maladie parce que les glucocorticoïdes de synthèse n'ont pas d'activité minéralocorticoïdes.

1.2.1 Le syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH

Le syndrome de Cushing endogène a des origines pathophysiologiques diverses et touche environ dix nouveaux patients par millions d'individus chaque année. La plupart des cas de syndrome de Cushing endogène (80 %) sont dépendants de l'ACTH. Chez ces patients, la sécrétion d'ACTH est continue, ce qui entraîne une libération ininterrompue de cortisol (Boyar et al., 1979 et Liu et al., 1987). L'augmentation du niveau d'ACTH plasmatique conduit également à l'induction de l'expression de facteurs de croissance tels que l'IGF-II et le TGF- β , ce qui provoque une hyperplasie du cortex surrénalien et plus particulièrement des zones fasciculée et réticulée. Les cellules devenues hyperplasiques à la suite d'une stimulation prolongée à l'ACTH n'ont pas la capacité de produire du cortisol de manière autonome, contrairement à ce qui est observé dans les cas d'hyperplasies primaires. La répression de l'axe hypothalamo-hypophysosurrénalien par le cortisol conduit également à l'atrophie des cellules corticotropes hypophysaires normales.

Bien que le cortisol soit la principale hormone à être sécrétée de manière excessive chez les patients souffrant du syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH, d'autres hormones dont la sécrétion se trouve aussi sous le contrôle de l'ACTH peuvent également être produites de manière excessive. C'est le cas

notamment de la DHEA et de la DHEA-S, produites par la zone réticulée. La conversion de ces hormones en testostérone provoque un excès d'androgènes, responsable de l'hirsutisme et de l'aménorrhée chez la femme. Toutefois, la production d'androgènes par le cortex surrénalien n'est en rien comparable à la production d'androgènes par les gonades, même chez ces patients.

La présence d'une tumeur des cellules corticotrope de l'hypophyse est responsable de l'excès d'ACTH chez 80 % des patients (maladie de Cushing) alors que la production ectopique d'ACTH survient chez dans environ 20 % des cas. La sécrétion ectopique de CRH est rare (Tableau 1,2).

Tableau 1,2. Étiologies du syndrome de Cushing endogène chez l'adulte

dépendant de l'ACTH	80 %
adénome corticotrope hypophysaire	80 %
sécrétion ectopique d'ACTH	20 %
sécrétion ectopique de CRH	rare
indépendant de l'ACTH	20 %
tumeur unilatérale de la surrénale (adénome /carcinome)	90 %
hyperplasie bilatérale de la surrénale	10 %
hypesensibilité aux glucocorticoïdes	rare
sécrétion ectopique de cortisol	rare

1.2.1.1 La maladie de Cushing

La plupart des patients traités pour la maladie de Cushing ont un adénome hypophysaire qui sécrète de l'ACTH et la tumeur mesure généralement moins de un centimètre (microadénome). Cependant, dans 5 % des cas, il s'agit d'un macroadénome. L'hyperplasie des cellules corticotropes et le carcinome hypophysaire sont rares.

Chez les patients souffrant de la maladie de Cushing, le développement de la maladie est rapide dû à la stimulation continue de la surrénale par l'ACTH. Toutefois, la taille de la corticosurrénale et la sécrétion de cortisol reviennent éventuellement à la normale suite à la résection de l'adénome hypophysaire et à la récupération des cellules corticotropes normales.

La maladie de Cushing présente un ratio homme / femme plus élevé avant la puberté puis le ratio s'inverse et la fréquence de la maladie devient plus élevée chez les femmes où elle prédomine à l'âge adulte (Savage et al., 1996 ; Giraldi et al., 2003 et Storr et al., 2004). Bien que la raison exacte de ce changement dans le ratio homme / femme ne soit pas encore connue, il semble probable que des changements hormonaux survenant à la puberté soient impliqués. Bien que les symptômes de la maladie puissent apparaître à tous âges, les patients sont souvent âgés entre 25 ans et 40 ans.

1.2.1.2 Sécrétion ectopique d'ACTH

La principale cause de sécrétion ectopique d'ACTH est le cancer du poumon (55 %). Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Brown en 1928 chez un patient qui avait un carcinome pulmonaire et une augmentation de la taille de la surrénale (Brown et al., 1928). Quarante ans plus tard, l'association était faite entre le syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH et certaines tumeurs non hypophysaires (Strott et al., 1968 et Liddle et al., 1969). Depuis, de nombreux autres cas ont été rapportés (Malchoff et al., 1988 ; Arioglu et al., 1998 ; Aniszewski et al., 2001 ; Amer et al., 2001 ; Sugawara et al., 2002).

Outre le cancer du poumon, des tumeurs malignes de la médullaire thyroïdienne (5 %), du pancréas, de la prostate, du sein, de l'ovaire et du colon (10%) peuvent sécréter l'ACTH de manière ectopique (Aniszewski et al., 2001 ; Orth DN, 1987 et Ilias et al., 2005). Quelques cas de sécrétion ectopique d'ACTH par des carcinomes du duodénum dont deux cas japonais ont également été rapportés (Nakao et al., 1975 ; Nishigucji et al., 1987 ; Uecker et al., 2005). Certaines tumeurs bénignes tels que les carcinoïdes du poumon (10 %), du thymus (5 %) du pancréas (10 %), les phéochromocytomes (3 %) et autres (2 %) sont aussi impliquées (Aniszewski et al., 2001 ; Orth DN, 1987 et Ilias et al., 2005).

Bien que les mécanismes responsables de l'expression ectopique d'ACTH dans ces tumeurs ne soient pas encore pleinement élucidés, la répression ou l'expression inappropriée de certains gènes spécifiques aux cellules corticotropes de l'hypophyse est probablement impliquée (Pascual-Le Tallec et al., 2002). Entre autres, il a été démontré que le promoteur du précurseur POMC est fortement méthylé dans les tissus qui ne produisent pas d'ACTH, mais pas dans les cellules corticotropes de l'hypophyse, ni dans les tumeurs extra-hypophysaires qui sécrètent de l'ACTH. Cette méthylation survient dans une région du promoteur nécessaire à l'expression du POMC et liée par le facteur de transcription PTX1, ce qui pourrait expliquer le rôle de la méthylation dans ce processus (Newell-Price J, 2003).

Les cas de syndrome de Cushing associés à une sécrétion ectopique d'ACTH sont plus fréquemment observés chez les hommes, la principale cause de ce syndrome, le cancer du poumon, étant plus fréquente chez ceux-ci. Cependant, ce ratio tend à être modifié, de plus en plus de femmes étant touchées par une tumeur pulmonaire. Le syndrome de Cushing dû à une sécrétion ectopique d'ACTH est d'ailleurs observé principalement après 40 ans, âge à partir duquel se développe la plupart des tumeurs pulmonaires.

1.2.1.3 Autres cas

Dans de rares cas, la relâche excessive d'ACTH d'origine hypophysaire est due à une production tumorale ectopique de CRF (Carey et al., 1984). La plupart des tumeurs sécrétrices de CRF sont des carcinoïdes bronchiques. Chez ces patients, les cellules corticotropes hypophysaires sont constamment stimulées ce qui provoque leur hyperplasie.

1.2.2 Syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH

La production excessive de cortisol peut également survenir en absence d'ACTH chez environ 20 % des patients. Les causes du syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH sont multiples. Dans 90 % des cas, il s'agit d'une

tumeur de la surrénale (adénome ou carcinome) alors que les hyperplasies corticosurrénaliennes bilatérales (AIMAH et PPNAD) sont responsables de 10 % des cas. Le syndrome d'hypersensibilité aux glucocorticoïdes et la sécrétion ectopique de cortisol sont aussi impliqués dans de très rares cas. Chez les patients souffrant du syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH, le rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol sur la production de CRF et d'ACTH provoque l'atrophie du cortex surrénalien normale (Figure 1,10D).

1.2.2.1 Les tumeurs corticosurrénaliennes

Pour des raisons encore inconnues, les tumeurs corticosurrénaliennes sont plus fréquentes chez la femme que chez l'homme avec un ratio de 4 pour 1 dans le cas des adénomes et de 2 pour 1 dans le cas des carcinomes (Bertagna et al., 1981 ; Ross et al., 1994 ; Latronico et al., 1997 ; Bornstein et al., 1999). Ces tumeurs sécrètent généralement du cortisol (syndrome de Cushing), mais la relâche de minéralocorticoïdes (hyperaldostéronisme) (Honda et al., 2001 ; Imai et al., 1991 ; Baert et al., 1995) ou d'androgènes (virilisme) est également possible. Certaines tumeurs non fonctionnelles ne sécrètent aucune hormone. Elles sont souvent détectées lors d'une imagerie abdominale (incidentalome) ou chez des patients qui présentent des symptômes reliés à la croissance tumorale. Bien que la plupart des tumeurs du cortex surrénalien soient unilatérales, une faible proportion (2 %) se présente sous forme bilatérale.

L'adénome est une tumeur bénigne, qui se développe généralement vers l'âge de 35 ans, et qui est responsable d'environ 60 % des tumeurs corticosurrénaliennes. Il se présente sous forme d'une lésion nodulaire jaunâtre de quelques millimètres à quelques centimètres et les cellules qui le composent sont riches en lipides comme celles qui siègent dans le cortex surrénalien normal.

Le carcinome (Gicquel et al., 1997 ; Wajchenberg et al., 2000 ; NG L et Libertino JM, 2003) représente environ 40 % des tumeurs corticosurrénaliennes

chez l'adulte. Son apparition suit une distribution bimodale avec un premier pic chez l'enfant de moins de 10 ans (Liou LS et Kay R, 2000) et un second chez l'adulte âgé de quarante à cinquante ans (Stratakis CA et Chrousos GP, 2000). Le carcinome est une tumeur maligne de plus de vingt centimètres formée de grosses cellules atypiques qui envahit la veine surrénalienne et la veine cave provoquant l'apparition rapide de métastases. Le pronostic est mauvais à court terme sauf chez l'enfant où les chances de rémission sont plus grandes.

La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale est le résultat de plusieurs mutations qui aboutissent à la naissance et au maintien d'une cellule immortelle. Les gènes impliqués dans ce processus sont principalement ceux qui stimulent la croissance (proto-oncogène), qui freinent la croissance (suppresseur de tumeurs), qui régulent l'apoptose ou qui réparent l'ADN. Bien que plusieurs anomalies génétiques aient été observées dans les tumeurs du cortex surrénalien (Reincke M, 1998 ; Koch et al., 2002 ; Stratakis CA, 2003 ; Groussin et al., 2007), les mécanismes moléculaires qui conduisent au développement et à l'évolution de ces tumeurs sont encore mal compris.

Contrairement à ce qui est observé dans les autres tissus, l'AMPc stimule la prolifération des cellules endocriniennes (Dumont et al., 1989). De nombreuses anomalies génétiques qui conduisent à l'activation constitutive de cette voie de signalisation ont d'ailleurs été identifiées dans une multitude de tumeurs endocriniennes. Par exemple, l'hypersécrétion de GHRH contribue à l'hyperplasie des cellules somatotropes alors que l'hypersécrétion de TSH entraîne la formation d'un goitre et une hyperthyroïdie.

Dans certains cas, il est possible qu'une mutation du domaine d'interaction récepteur / ligand entraîne la liaison illicite d'un ligand, comme le récepteur à la TSH qui lie le hCG dans de rares cas d'hyperthyroïdie transitoire observés pendant la grossesse. Une mutation d'un récepteur couplé à la $G_{\alpha s}$ peut également expliquer la croissance cellulaire. C'est le cas notamment dans la

puberté précoce d'origine familiale chez le garçon (Shenker et al., 1993), où une mutation du récepteur à la LH a été détectée, de même que dans certains cas d'adénomes thyroïdiens qui présentent une mutation du récepteur à la TSH (Parma et al., 1993 ; Van Sande et al., 1995). La plupart des mutations qui touchent ces récepteurs sont localisées dans le domaine C-terminal qui catalyse l'échange GTP-GDP.

Les mutations peuvent également survenir directement dans la sous-unité α de la protéine G. Ce type d'anomalie génétique est fréquemment observé dans les adénomes hypophysaires qui sécrètent la GH (Vallar et al., 1987 ; Landis et al., 1989 ; Lyons et al., 1990 ; Climenti et al., 1990), de même que dans de nombreuses tumeurs de la thyroïde (Saurez et al., 1991 ; O'Sullivan et al., 1991) et dans le syndrome de McCune-Albright. Une mutation de cette sous-unité a aussi été identifiée dans certains insulinomes et dans des tumeurs endocriniennes variées (Zeiger MA et Norton JA, 1993). La plupart des mutations qui touchent la $G_{\alpha s}$ sont localisées dans le domaine qui catalyse l'échange GTP-GDP ou affectent l'activité GTPase (Master et al., 1989).

Lorsque la mutation survient plus en aval, la PKA ou le facteur de transcription CREB peuvent être impliqués. La PKA est composée de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques qui sont libérées par la liaison de l'AMPc. Une mutation de la sous-unité régulatrice (*PRKA1A*) entraîne l'activation constitutive de l'enzyme comme c'est le cas dans le complexe de Carney ainsi que dans une multitude de néoplasmes thyroïdiens. Le facteur de transcription CREB, phosphorylé par la PKA sur la sérine 133, lie l'élément de réponse TGACGTCA sous forme de dimères. Deux autres facteurs de transcription (CREM et ATF-1), qui répondent également à l'AMPc, lient le même consensus. Alors que CREB et ATF-1 stimulent la transcription, certains isoformes de CREM la répriment. Tout comme les autres constituants de la voie de signalisation de l'AMPc, les membres de cette famille semblent pouvoir jouer un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire et dans le

thyroïde alors que son activation constitutive entraîne une hyperplasie. Dans les H295R, une lignée cellulaire établie à partir d'un carcinome surrénalien, l'expression de CREB est abolie alors que celle de CREM τ augmente (Groussin et al., 2000).

Dans les tumeurs corticosurréaliennes, les anomalies qui impliquent la voie de l'AMPc ne semblent pas fréquentes. Aucune mutation du MC2R n'a été identifiée jusqu'à présent (Latrocino et al., 1995 ; Light et al., 1995). Les mutations de la G α_s , bien que possible, sont plutôt observées chez les patients qui présentent une hyperplasie macronodulaire associée au syndrome de McCune-Albright (section 1.2.2.3). De même, des mutations de la PKA sont fréquemment détectées dans les nodules corticosurréaliens chez les patients qui ont une dysplasie micronodulaire pigmentaire (section 1.2.2.2), mais seuls quelques rares cas d'adénomes surréaliens reliés à ces mêmes mutations ont été rapportés (Bertherat et al., 2003). À ce jour, aucune autre mutation reliée à la voie de signalisation de l'AMPc n'a été décrite dans les tumeurs du cortex surrénalien.

Dans les tumeurs du cortex surrénalien, la perte d'hétérozygotie de la région 17p13 est fréquente (Libè et al., 2007). Des mutations du gène suppresseur de tumeurs *TP53*, présent dans cette région, sont fréquemment observées. Cependant, une grande proportion demeure inexpiquée, ce qui suggère que d'autres suppresseurs de tumeurs sont localisés à ce locus. Les mutations de p53 sont rapportées aussi bien dans les adénomes que dans les carcinomes (Reinke et al., 1994), mais généralement dans les tumeurs peu différenciées, ce qui indique que c'est un événement tardif dans le développement des tumeurs du cortex surrénalien (Lin et al., 1994). Elles sont retrouvées la plupart du temps dans des tumeurs isolées (Latronico et al., 2001), mais également associées à une prédisposition héréditaire à de multiples tumeurs, le syndrome de Li-Fraumeni (Malkin et al., 1990).

Les modifications génétiques de la région 11p15 semblent également survenir fréquemment dans les tumeurs corticosurréaliennes. Une délétion de cette région a été mise en cause dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann, un désordre lié à la croissance et qui augmente l'incidence de nombreuses tumeurs dont celles du cortex surrénalien (Maher ER et Reik W, 2000). Cette délétion a aussi été identifiée dans quelques tumeurs sporadiques. La région 11p15 englobe aussi la perte allélique de p57^{KIP2}, un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines. Toutefois, l'anomalie génétique la plus souvent retrouvée dans cette région est la perte d'hétérozygotie de la région 11p15,5 liée à l'augmentation de l'expression de l'IGF-II (Gicquel et al., 1997 ; Gicquel et al., 2001). La région 11p15,5 regroupe deux gènes, un suppresseur de tumeurs (H19) et un proto-oncogène (IGF-II). L'expression de ces deux gènes est soumise à une empreinte parentale qui permet l'expression de H19 sur le chromosome maternel et de l'IGF-II sur le chromosome paternel (Figure 1,11). En amont du gène H19 se trouve une région potentiellement méthylée alors qu'un enhancer se lie juste en aval. Le chromosome maternel n'est pas méthylé et l'enhancer peut lier le promoteur et interagir avec d'autres facteurs de transcription pour stimuler la transcription de H19. L'expression de l'IGF-II est inhibée en raison de l'incapacité de son promoteur à recruter l'enhancer. Le chromosome paternel est méthylé en amont de H19 ce qui empêche la liaison de l'enhancer qui est disponible pour activer l'expression de l'IGF-II (Gao et al., 2002). La perte de cet allèle sur le chromosome maternel et sa duplication sur le chromosome paternel entraînent la perte de l'expression de H19 et la l'expression accrue de l'IGF-II. Cette anomalie génétique est observée dans la majorité des carcinomes (90 %), mais ne semble pas présente dans les adénomes ce qui suggère que ce gène puisse être important dans la progression des tumeurs et dans le développement du phénotype malin.

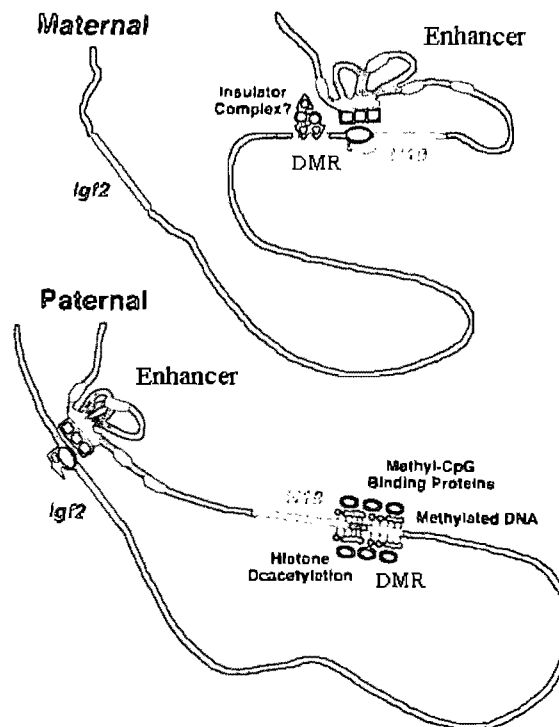


Figure 1,11. Régulation de l'expression génique de H19 et de IGF-II (Gao et al., 2002).

L'expression du facteur de transcription CREB est parfois abolie dans les tumeurs du cortex surrénalien (Rosenberg et al., 2003) alors qu'une hausse de l'expression de gènes associés aux cancers primaires (hTERT, Bcl-2) a été observée. Dans quelques rares carcinomes, une anomalie de la protéine p16, un inhibiteur de la cdk4, a été détectée (Pilon et al., 1999). Une mutation de l'oncogène ras a aussi été décrite chez quelques patients (Lin et al., 1999). Plus récemment, l'implication de la voie de signalisation Wnt a également pu être démontrée grâce à des études de profilage génétique (Bourdeau et al., 2004). Lors d'une étude à plus grande échelle, une mutation activatrice de la β -caténine a été identifiée dans cinq des trente-trois adénomes testés, mais pas dans les quatre carcinomes, ni dans les treize cas d'hyperplasie macronodulaire. La mutation a cependant été retrouvée dans les H295R (Tadjine et al., 2007). Une étude précédente avait également identifié la mutation aussi bien dans les adénomes que dans les carcinomes (Tissier et al., 2005).

1.2.2.2 La dysplasie micronodulaire pigmentaire

Les affections bilatérales de la surrénale représentent environ 10 % des cas de syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH (Stratakis CA et Kirschner LS, 1998 ; Lacroix A et Bourdeau I, 2002). On en distingue deux formes principales : la dysplasie micronodulaire pigmentaire et l'hyperplasie macronodulaire.

La dysplasie micronodulaire pigmentaire (PPNAD) est principalement diagnostiquée chez le jeune adulte (Larsen et al., 1986). De petits nodules pigmentés noirs ou bruns (moins de quatre millimètres), secondaires à la présence de lipofuscine, sont répartis sur toute la surface de la glande dont la taille globale reste habituellement normale alors que le cortex internodulaire devient atrophique.

Le PPNAD peut causer un syndrome de Cushing classique ou une forme d'hypercorticisme atypique qui peut être associée à un syndrome de Cushing épisodique. Les patients qui présentent une forme de syndrome de Cushing épisodique (Meinard et al., 2007) ont généralement un taux normal de cortisol pendant plusieurs semaines, période suivie par des jours ou des semaines d'hypercorticisme. Le PPNAD peut également se présenter sans hypercorticisme apparent. Chez ces patients, la sécrétion de cortisol sur 24 h est normale, mais ne suit pas un rythme circadien comme c'est le cas en physiologie normale. Le PPNAD est souvent associé au complexe de Carney (Stratakis CA, 2002), dont il est la manifestation la plus fréquente. Toutefois, il peut également survenir sans autres manifestations cliniques.

Bien que les mécanismes qui conduisent à l'apparition des nodules sur le cortex surrénalien ne soient pas encore pleinement élucidés, des études de plus en plus nombreuses commencent à mettre en évidence des pistes de recherche intéressantes. Environ 60 % des cas de PPNAD liés au complexe de Carney sont dus à une mutation de la sous-unité 1A de la PKA (*PRKARIA*), résultant en une

activation constitutive des sous-unités catalytiques et une production continue de cortisol (Casey et al., 2000 ; Kirschner et al., 2000a ; Kirschner et al., 2000b ; Groussin et al., 2002a ; Cazabat et al., 2006). Une mutation *de novo* de la *PRKARIA* dans la lignée germinale peut aussi être observé dans certains cas de PPNAD sporadique (Groussin et al., 2002a). Plus récemment, une mutation inactivatrice de la phosphodiesterase 11A (*PDE11A*) possiblement impliquée dans l'hyperplasie a été identifiée (Horvath et al., 2006). Une expression élevée du récepteur aux glucocorticoïdes a aussi été rapportée (Bourdeau I et al., 2003). Cependant, chez plusieurs patients, la cause moléculaire exacte de la maladie est encore inconnue.

1.2.2.3 L'hyperplasie macronodulaire bilatérale

L'AIMAH (Bourdeau I et al., 2007) se caractérise par la présence de plusieurs nodules non pigmentés (moins de quatre centimètres) à la surface d'une glande dont les zones internodulaires sont atrophiques. Les nodules s'organisent en cordons de cellules compactes combinés à des îlots de cellules claires riches en lipides. Ces deux populations de cellules possèdent un profil d'enzymes stéroïdogéniques qui lui est propre. Par exemple, la 3 β -HSD2 est exprimée dans les larges cellules claires uniquement alors que la P450C17 est surtout présente dans les cellules compactes. La P450scc, la P450C21 et la P450C11 sont détectées dans les deux populations cellulaires.

La manifestation clinique la plus fréquente des AIMAH est le syndrome de Cushing (production excessive de cortisol), mais comme pour les tumeurs du cortex surrénalien, la relâche de minéralocorticoïdes (hyperaldostéronisme) (Hayashi et al., 1998) ou d'androgènes (virilisme) par les nodules est également possible. La moyenne d'âge des patients souffrant d'AIMAH est d'environ 50 ans. Ces patients sont aussi bien des hommes que des femmes, quoique certaines formes particulières comme le syndrome de Cushing dépendant du GIP semblent plus fréquentes chez la femme.

Jusqu'à présent, la plupart des cas d'AIMAH étaient considérés comme sporadiques, bien qu'une détection systématique n'ait jamais été effectuée. Malgré tout, quelques cas familiaux ont été décrits (Findlay et al. 1993 ; Minami et al., 1996 ; Nies et al., 2002 ; Imohl et al., 2002 ; Matyakhina et al., 2005) ouvrant la voie à une recherche plus approfondie dans ce domaine.

La synthèse de cortisol par les cellules corticosurréaliennes normales se trouve sous le contrôle de l'ACTH et de son récepteur, qui est couplé à la voie de signalisation de l'AMPc. C'est pourquoi la possibilité qu'une mutation du MC2R ou d'une molécule impliquée dans la signalisation de son message puisse être responsable des cas d'AIMAH a d'abord été explorée (Bourdeau et al., 2002). Une mutation du MC2R (arginine 201) qui entraîne une activation constitutive de la voie de signalisation de l'AMPc a été identifiée chez quelques rares patients (Swords et al., 2002 ; Swords et al., 2004).

D'autres études ont également permis d'identifier une mutation de la $G_{\alpha s}$, la protéine responsable de l'activation de l'adénylate cyclase, chez quelques patients atteints d'AIMAH (Barisson et al., 2003 ; Fragoso et al., 2003), généralement en association avec le syndrome de McCune-Albright (McCune et al., 1937 ; Albright et al., 1937 ; Murras N et Blizzard RM, 1986 ; Weinstein et al., 1991 ; Levine MA, 1999). Chez les patients qui souffrent du syndrome de McCune-Albright, la $G_{\alpha s}$ mutée est présente dans d'autres tissus que les glandes surrénales ce qui suggère une origine embryonnaire précoce. Plus la mutation survient tôt durant le développement, plus le nombre de cellules touché est élevé et plus sévères sont les symptômes. L'activation constitutive de la $G_{\alpha s}$ est également observée dans la corticosurrénale de certains patients sans autres manifestations de la maladie de McCune-Albright (Fragoso et al., 2003).

L'hyperplasie macronodulaire peut parfois être associée avec le syndrome de néoplasies endocriniennes multiples de type 1 (MEN1) qui est dû à une mutation du gène suppresseur de tumeur MENIN (Skogseid et al., 1992), de

même qu'avec la polypose rectocolique diffuse d'origine familiale (FAP) causée par une mutation du gène APC (Marchesa et al., 1997).

Jusqu'à présent, aucune mutation de la *PRKARIA* n'a été identifiée dans le cortex surrénalien des patients avec AIMA. Cependant, des délétions du locus 17q22-24, région qui contient le gène *PRKARIA*, sont fréquemment retrouvées chez ces patients (Bourdeau et al., 2006), ce qui suggère la présence de gènes potentiellement impliqués dans le développement de l'AIMA à l'intérieur de ce locus.

Les anomalies génétiques décrites ci-dessus n'expliquent qu'une faible proportion des cas d'hypercorticismes primaires. Depuis quelques années, de plus en plus de cas d'AIMA secondaires à l'expression aberrante d'un ou de plusieurs récepteurs hormonaux ont été identifiés. Ces récepteurs appartenant à la famille des récepteurs à sept passages transmembrannaires liés aux protéines G hétérotrimériques sont également couplés à la voie de signalisation de l'AMPc, ce qui place la synthèse du cortisol sous le contrôle d'hormones autres que l'ACTH.

1.2.2.4 Autres

Quelques rares cas de sécrétion ectopique de cortisol par une tumeur ovarienne ont été rapportés (Marieb et al., 1983). De même, deux cas d'hypersécrétion de cortisol en présence de niveau bas d'ACTH ont également été décrits, probablement dus à une augmentation de nombre de récepteurs aux glucocorticoïdes.

1.2.3 Expression aberrante de récepteurs hormonaux dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing

Le concept de récepteurs ectopiques dans la surrénale a été proposé pour la première fois en 1971 par Schorr qui a observé que, dans la surrénale de rat normale, seule l'ACTH stimulait la stéroïdogénèse, alors que dans un modèle de

carcinome surrénalien de rat, l'épinéphrine, la norépinéphrine, la TSH, la LH, la FSH et la PGE stimulaient aussi l'AMPc (Schorr et al., 1971 et Schorr et Ney, 1971). L'activation de l'adénylate cyclase et de la cascade stéroïdogénique et le rôle de ces hormones dans la médiation du signal ont ensuite été confirmés par de nombreuses études (Brush et al., 1974 ; Millington et al., 1976 ; Williams et al., 1977 ; Perchellet JP et Sharma RK, 1980 ; Shanker et al., 1980 ; Katz et al., 1985 ; Wy et al., 2002). Une stéroïdogénèse accrue en présence d'hormones autres que l'ACTH a aussi été observée dans des adénomes (Pittaway et al., 1973 ; Matsukura et al., 1980 ; Hirata et al., 1981 ; Saez et al., 1975 ; Willenberg et al., 1998). Plus récemment, de nombreux groupes de chercheurs ont montré que la production de cortisol dans un certain nombre d'adénomes surrénaliens et une majorité d'AIMAH de la surrénale étaient sous le contrôle de récepteurs aberrants tel que le récepteur à la LH / hCG (LHR), le récepteur à la sérotonine (5-HT₄ et 5-HT₇), le récepteur à la vasopressine (V₁AVP, V₂AVP et V₃AVP), le récepteur β -adrénergique (β -AR) et le récepteur au GIP (GIPR). La présence de ces récepteurs place les cellules de la corticosurrénale sous le contrôle de facteurs qui ne sont pas régulés négativement par le cortisol ce qui entraîne une augmentation de la stéroïdogénèse (Lacroix A, 1995 ; Lacroix A et al., 2001 ; Bertagna et al., 2003 ; Lacroix A et al., 2004 ; Christopoulos et al., 2005 ; Bourdeau et al., 2007).

Les récepteurs hormonaux exprimés dans les adénomes ou les AIMAH sont exprimés de manière eutopique ou ectopique. Les récepteurs eutopiques sont présents dans la corticosurrénale, mais ils ne sont pas couplés à la synthèse du cortisol alors que les récepteurs ectopiques ne sont pas exprimés dans la corticosurrénale normale. La présence d'un récepteur ectopique peut s'expliquer par une modification de la régulation normale de l'expression du gène codant pour ce récepteur dans la corticosurrénale des patients. Dans le cas des récepteurs eutopiques, il est possible qu'une mutation active le récepteur de manière constitutive ou encore que la transmission du signal soit plus efficace en raison d'une mutation dans la voie de signalisation de l'AMPc. Par ailleurs,

bien que les premiers cas rapportés dans la littérature décrivent l'expression de récepteurs uniques, de plus en plus d'études suggèrent la présence d'une combinaison de récepteurs aberrants dans la corticosurrénale des patients aussi bien dans les adénomes que dans les AIMAH.

La production de cortisol chez les patients qui expriment un récepteur aberrant se fait suivant un rythme propre à chaque hormone. L'expression aberrante du récepteur LH/hCG (Segaloff DL et Ascoli M, 1993 ; Ascoli M et al., 2002) illustre très bien ce phénomène. Le récepteur LH/hCG est un récepteur couplé aux protéines G de la famille du récepteur β -adrénergique. Son action est principalement médiée par la voie de la PLC. Dans les gonades, le récepteur LH/hCG stimule la stéroïdogénèse. Cependant, bien qu'il soit faiblement présent dans les zones réticulée et fasciculée profonde (Pabon et al., 1996), la LH ne joue pas un rôle significatif dans la production des stéroïdes surrénaliens chez l'adulte alors que le hCG est responsable de la production surrénalienne de DHEAS pendant la vie fœtale (Seron-Ferre et al., 1978).

Chez les patientes qui souffrent d'un syndrome de Cushing associé au récepteur LH/hCG, une hausse de la production de cortisol est d'abord observée lors d'une grossesse, période durant laquelle la taille de la corticosurrénale augmente suite à l'activation prolongée du récepteur par l'hCG. Après l'accouchement, la baisse de la production d'hCG entraîne un arrêt de la stimulation excessive ce qui permet à la surrénale de retrouver sa taille normale. Si rien n'est fait, les symptômes réapparaîtront après la ménopause lorsque le niveau de LH s'élèvera de façon permanente. L'effet de l'hormone sera alors continu et le développement progressif de l'hyperplasie macronodulaire de la surrénale sera observé.

Notre équipe a identifié un premier cas de syndrome de Cushing dépendant de la LH chez une patiente qui avait présenté des épisodes transitoires de Cushing durant ses grossesses, puis un syndrome de Cushing persistant, 10 ans après le

début de sa ménopause (Lacroix et al., 1999). L'étude de ce cas a également permis de mettre en évidence une réponse aberrante aux agonistes du récepteur 5-HT₄ de la sérotonine (Lacroix et al. 1999). Tout comme le récepteur à la LH, le récepteur 5-HT₄ est faiblement exprimé dans la corticosurrénale normale et couplé à la production d'aldostérone par l'intermédiaire de la voie de l'AMPC (Lefebvre et al., 1992 ; Lefebvre et al., 1993 et Lefebvre et al., 1995 ; Lefebvre et al., 1998), mais son rôle dans la production de cortisol n'est pas biologiquement significatif. Après la découverte de ce cas, d'autres patients qui présentaient une réponse anormale à la LH ou à la sérotonine ont été décrits (Bourdeau et al., 2001 ; Yared et al., 2002 ; Cartier et al., 2003 ; Mannelli et al., 2003 ; Feelders et al., 2003 ; Gooderzi et al., 2003 ; Contesse et al., 2005 ; Louiset et al., 2006). Chez les patients qui souffrent de cette forme de syndrome de Cushing, la production de cortisol s'explique par une expression accrue du récepteur ou par une réponse exagérée de ce récepteur à une concentration physiologique de l'hormone. Aucune mutation de la région codante n'a cependant été rapportée. La présence d'un récepteur 5-HT₇ ectopique a aussi été identifiée chez deux patients (Louiset et al., 2006). Deux patients chez qui la sérotonine inhibe la sécrétion de cortisol in vitro ont également été décrits. Cette réponse n'est pas médiée par le 5-HT₄ et le sous-type impliqué dans cet effet demeure inconnu, de même que l'implication in vivo d'une telle observation (Louiset et al., 2004). La présence d'un récepteur à la sérotonine aberrant jumelée à celle du récepteur à la vasopressine a aussi été observée dans un cas d'AIMAH familial (Vezzosi et al., 2007).

D'autres cas de patients atteints du syndrome de Cushing qui répondaient de manière anormale à la vasopressine ont également été rapportés (Hakaki et al., 1989 ; Horiba et al., 1995 ; Perraudin et al., 1995 ; Lacroix et al., 1997 ; Iida et al., 1997 ; Daidoh et al., 1998 ; Yamakita et al., 1997 ; Arnaldi et al., 1998). La vasopressine est capable de se lier à trois récepteurs, chacun exprimé dans des tissus spécifiques et couplé à une voie de signalisation qui lui est propre. Le récepteur V₁-AVP est principalement vasculaire et couplé à la phospholipase C

alors que le V₂-AVP est surtout présent dans le rein et stimule la production d'AMPC. Le récepteur V₃-AVP est exprimé de manière ubiquitaire et son action est médiée par la phospholipase C (Thibonnier et al., 2002). Le récepteur V₁-AVP est faiblement exprimé dans la corticosurrénale (Gallo-Payet N et Guillon G, 1998), mais *in vivo*, l'administration de vasopressine ne semble pas moduler la stéroïdogénèse. Les récepteurs V₂-AVP et V₃-AVP ne sont pas présents dans la corticosurrénale (Arnaldi et al., 1998 ; Lacroix et al., 1997 ; Arnaldi et al., 1998 ; Gallo-Payet N et Guillon G, 1998). Cependant, le V₃-AVP est exprimé dans les cellules chromaffines (Gallo-Payet N et Guillon G, 1998 ; Guillon G et al., 1998) où la vasopressine peut stimuler la relâche des catécholamines. Tout comme les récepteurs à la LH/hCG et à la sérotonine, la production aberrante de cortisol en réponse à la vasopressine peut avoir pour origine une hausse de l'expression du récepteur (Mune et al., 2002 ; Campbell et al., 2004) ou une réponse excessive du récepteur suite à une stimulation. Aucune mutation du récepteur V₁-AVP n'a été observée jusqu'à présent. L'expression aberrante des récepteurs V₂-AVP et V₃-AVP a aussi été identifiée *in vitro*, mais aucune donnée *in vivo* n'a jamais confirmé cette observation (Mune et al., 2002).

Notre équipe a aussi rapporté le cas d'un patient chez qui la production excessive de cortisol se trouvait sous le contrôle d'un récepteur β -adrénergique aberrant (Lacroix et al., 1997). Peu de cas d'expression ectopique de ce récepteur ont cependant été décrits et tous sont des AIMAH (Mircescu et al., 2000 ; Mazzuco et al., 2002 ; Imhol et al., 2002 ; Miyamura et al., 2003). *In vivo*, les catécholamines ont un effet sur la sécrétion d'aldostérone, mais pas sur la production de cortisol (Lacroix et al., 1997) alors que chez les patients, l'isoprotérénol, un agoniste β -adrénergique, stimule la relâche du cortisol. Un pré-traitement avec le propranolol, un antagoniste, diminue cette réponse. La présence des récepteurs β 1-adrénergique et β 2-adrénergique, tous deux couplés à la production d'AMPC, a également été démontrée *in vitro*.

Le cas d'un patient où la stéroïdogénèse était sous le contrôle du récepteur à l'angiotensine II (AT-1) a été étudié par un groupe japonais (Nakamura et al., 2001) ainsi que par un groupe français (Bertherat et al., 2004). Dans les deux cas, il semble que l'administration de candesartan, un antagoniste, inhibe la réponse. Cependant, l'expression du récepteur n'a pas été démontrée *in vitro*. Le récepteur AT-1 est couplé à la G_q et stimule la production d'IP3 et de diacylglycérol par l'intermédiaire de la PLC. Cependant, son activation entraîne aussi la stimulation des MAPK (ERK1/2) ce qui pourrait expliquer son effet prolifératif même s'il n'est pas couplé à la voie de l'AMPc.

Notre équipe a été la première à décrire le cas d'un patient chez qui la production de cortisol était dépendante de l'alimentation (Hamet et al., 1987) chez un homme de 41 ans porteur d'un adénome surrénalien. Chez ce patient, l'augmentation du niveau de cortisol plasmatique semblait suivre les repas. Le modulateur endogène de la production de cortisol ne fut pas déterminé, mais il fut proposé qu'une hormone induite par l'ingestion de nourriture était responsable de cet effet. L'idée que la production excessive de cortisol puisse être régulée par le GIP chez les patients qui souffrent de cette forme de syndrome de Cushing est venue à la suite de l'observation que le taux de cortisol plasmatique était augmenté par l'administration orale de glucose, par un repas riche en lipides ou en protéines, mais pas par une administration de glucose intraveineux (Lacroix et al., 1992 ; Reznick et al., 1992) alors que la stéroïdogénèse n'est pas stimulée par le GIP dans les cellules corticosurrénaliennes normales adultes et fœtales (Lacroix et al., 1992). La présence de l'ARNm et du récepteur au GIP non muté dans la surrénale de ces patients a ensuite été démontrée (N'Diaye et al., 1998). Depuis, le syndrome de Cushing dépendant du GIP a été identifié chez plus de trente patients à travers le monde (Hamet et al., 1987 ; Reznick et al., 1992 ; Lacroix et al., 1992 ; Mahoudeau J et Reznick Y, 1993 ; Comas et al., 1995 ; de Herder et al., 1996 ; Chabre et al., 1998 ; Combes et al., 1998 ; Lebrethon et al., 1998 ; Luton et al., 1998 ; Croughs et al., 2000 ; Bourdeau et al., 2001 ; Groussin et al., 2002 ;

Bertherat et al., 2004) ce qui en fait le récepteur ectopique le plus largement décrit. La présence combinée du GIPR et du récepteur LH/hCG a également été rapportée chez un patient (Bertherat et al., 2001), de même que l'expression ectopique du GIPR et du récepteur à la leptine (Pralong et al., 1999). Un cas associé à un adénome unilatéral chez un adolescent de 15 ans a été aussi décrit (Noordam et al., 2002). Par ailleurs, la présence ectopique du GIPR dans la corticosurrénale a été détectée chez un patient qui sécrétait des androgènes de manière excessive (Tsagarakis et al., 2001). Chez les patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP, le développement tumoral est lent puisque la stimulation de la corticosurrénale est intermittente suite l'augmentation transitoire du GIP après l'absorption des repas.

D'autres études in vitro ont aussi montré la présence de récepteurs pour la thyrotrophine, la FSH, le glucagon et l'interleukine 1 dans la corticosurrénale de certains patients, mais la signification clinique de ces observations est encore inconnue (Hashimoto et al., 1986 ; Makino et al., 1989 ; Willenberg et al., 1998 ; Lacroix et al., 2001 ; Yared et al., 2002 ; Lefebvre et al., 2003 ; Lacroix et al., 2004). Une étude de profilage génétique à grande échelle réalisée dans notre laboratoire a également démontré la présence possible de d'autres récepteurs couplés aux protéines G dans les AIMAH ce qui suggère que la liste des récepteurs aberrants impliqués dans l'apparition du syndrome de Cushing est appelée à prendre de l'ampleur.

Un nombre limité de cas de syndrome de Cushing impliquant des récepteurs aberrants a initialement été décrit dans la littérature. Toutefois, la recherche systématique de ces récepteurs n'avait jamais été entreprise dans des populations de patients atteints de syndrome de Cushing surrénalien. Notre équipe a été la première à effectuer la détection systématique de récepteurs aberrants chez les patients souffrants d'AIMAH, d'adénomes ou de carcinomes surrénaliens. La première étude publiée portait sur vingt patients (six AIMAH, treize adénomes et un carcinome) et a montré une réponse anormale à au moins

une hormone chez les six cas d'AIMAH ainsi que dans quatre des treize cas d'adénomes surrenaliens. Aucune réponse n'a été observée chez le patient qui souffrait d'un carcinome surrenalien (Mircescu et al., 2000). Des résultats similaires ont ensuite été obtenus par d'autres centres (Groussin et al., 2002 ; Bertherat et al., 2004 ; Reznik et al., 2004). Ces données, bien que préliminaires, suggèrent que les récepteurs aberrants pourraient être un phénomène beaucoup plus fréquent que ce qui a d'abord été estimé, principalement dans les cas d'AIMAH.

Quelques cas d'AIMAH familiaux avec expression aberrante de récepteurs commencent à être identifiés. Les principaux récepteurs observés chez ces patients sont les mêmes que dans les cas sporadiques (V_1 -, V_2 - et V_3 -AVP, β -adrénergique et 5-HT₄) (Miyamura et al., 2002 ; Imohl et al., 2002 ; Lee et al., 2005 et Vezzosi et al., 2007).

Bien que les récepteurs aberrants soient observés dans les AIMAH et dans les adénomes unilatéraux, les événements génétiques impliqués sont probablement différents. Les AIMAH sont des affections bilatérales de la surrenale et les mutations responsables de l'expression aberrante d'un récepteur chez ces patients doivent survenir tôt durant le développement embryonnaire. Toutefois, l'expression anormale étant localisée dans la surrenale, ces mutations ne peuvent avoir lieu avant que les cellules qui formeront la surrenale n'aient migré pour former la surrenale primitive. À l'opposé, les adénomes sont des affections unilatérales et les mutations responsables de l'expression aberrante d'un récepteur peuvent être somatiques et survenir plus tard durant la vie du patient.

De plus en plus d'évidences suggèrent que les récepteurs couplés aux protéines G jouent le rôle d'oncogène dans le développement de certaines tumeurs ou hyperplasies (Dhanasekaran et al., 1995). Une étude a démontré que des souris transgéniques qui expriment le récepteur à l'adénosine A2 de manière ectopique

dans leurs cellules thyroïdiennes développent une hyperplasie et un sévère hyperthyroïdisme. Tout comme de nombreux récepteurs hormonaux détectés dans les adénomes surrenaliens et les AIMAH, le récepteur A2 active l'adénylate cyclase via la $G_{\alpha s}$ (Ledent et al., 1992), ce qui suggère qu'une activation anormale de cette voie est suffisante *in vivo* pour favoriser une prolifération cellulaire incontrôlée et une hyperfonction.

Dans les tumeurs et hyperplasies du cortex surrénalien détectés chez les patients qui souffrent d'un syndrome de Cushing dépendant du GIP, l'activation du GIPR est capable de stimuler l'incorporation de la thymidine au niveau de l'ADN, tout comme le fait l'ACTH (Chabre et al., 1998). De plus, le couplage à une voie de signalisation impliquée dans la croissance cellulaire (MAPK, PKB) a été établie pour de nombreux récepteurs hormonaux. L'effet prolifératif du GIP par l'intermédiaire de la voie MAPK a d'ailleurs été rapporté dans les adénomes du cortex surrénalien (Chabre et al., 1998).

Plus récemment, un modèle de transplantation hétérologue a permis l'observation de la formation d'un néo-organe, chez la souris surrenalectomisée, à partir de cellules corticosurréaliennes génétiquement modifiées pour exprimer de manière ectopique le récepteur à la LH/hCG ou le GIPR (Mazzuco et al., 2006). Chez ces souris, la greffe de cellules corticosurréaliennes normales donne naissance à un organe corticosurrénalien vascularisé, différencié et fonctionnel. Toutefois, un traitement au dexaméthasone, qui inhibe la relâche de l'ACTH, bloque la croissance cellulaire. L'analyse histologique du cortex qui exprime de manière ectopique le GIPR révèle la présence de cellules hétérogènes à l'aspect encapsulé, couplées à la stéroïdogénèse, qui rappellent l'adénome. De plus, chez ces souris, le traitement au dexaméthasone n'a pas d'effet sur le développement du néo-cortex. Les résultats obtenus dans cette étude montrent pour la première fois que l'ACTH joue un rôle important dans la morphologie du cortex surrénalien, mais

que la présence d'un récepteur hormonal tel que le GIPR est suffisante pour induire l'hyperprolifération et la stéroïdogénèse, même en absence d'ACTH.

Une expérience similaire a été réalisée pour le récepteur LH/hCG. La présence de ce récepteur dans le greffon a entraîné le développement d'un syndrome de Cushing. Suite à l'observation histologique, il a pu être démontré que l'expression aberrante du récepteur LH/hCG conduit à la formation d'un tissu corticosurrénalien qui possède toutes les caractéristiques d'une hyperplasie macronodulaire (Mazzucho et al., 2006). Aucun indice de malignité n'a été observé aussi bien chez les souris transgéniques exprimant le GIPR que chez celles exprimant le récepteur LH/hCG. (Mazzucho et al., 2007).

1.3 Le GIP

Dans les années 1960, les scientifiques découvrirent que la prise orale de glucose entraîne une sécrétion d'insuline supérieure à une administration intraveineuse (McIntyre et al., 1964) ce qui les amena à introduire la notion d'incrétine pour définir les hormones responsables de cet effet. Suite à cette observation, deux incrétines furent découvertes : le GLP-1 et le GIP (Ebert R et Creutzfeldt W, 1987 ; Holst JJ, 1994 ; Fehmann et al., 1995 ; Holst JJ et Orsov C, 2001 ; Holst JJ et Gromada J, 2004 ; Nauck et al., 2004 ; Drucker DJ, 2006).

Le GLP-1 est un peptide synthétisé par les cellules L de l'intestin, à partir du même précurseur que le glucagon (Figure 1,13) (Orskov et al., 1986 ; Mojsov et al., 1986 ; Weir et al., 1989 ; Nauck MA, 1997 ; Nauck, 1999). Dans la circulation, le GLP-1 est présent sous deux formes distinctes, (GLP-1[7-36]-amide et le GLP-1[7-37]), capables de lier un récepteur couplé aux protéines G de la famille du glucagon, le GLP-1R (Thorens et al., 1992). Ce récepteur est principalement couplé à la voie de l'AMPc (Drucker et al., 1987). Toutefois, son activation entraîne également la fermeture des canaux potassiques dépendant du potentiel de membrane et l'entrée de calcium dans la cellule (Leech et al., 1994), de même que l'activation de la PKC et de la voie des

MAPK (Trümper et al., 2005). Cette action multiple du GLP-1 sur la signalisation cellulaire contribue à la relâche de l'insuline par les cellules β du pancréas (Mosjov et al., 1989) ainsi qu'à la survie et à la prolifération cellulaire grâce, entre autres, à l'augmentation de l'expression de Bcl-2. L'inhibition de l'apoptose par l'intermédiaire de la répression de Bax compte aussi parmi les effets du GLP-1 (Farilla et al., 2003). Le GLP-1[7-36]-amide et le GLP-1[7-37] sont rapidement dégradés par une aminopeptidase, la dipeptidyl peptidase IV, en GLP-1[9-36]-amide et le GLP-1[9-37] (Meintlein et al., 1993 ; Deacon et al., 1995 ; Meintlein et al., 1999).

La recherche d'hormones à activité incrétine a conduit à la découverte d'un second peptide, le GIP. D'abord identifié pour son effet inhibiteur sur la sécrétion d'acide gastrique (Brown JC et Pederson RA, 1969 ; Brown JC et Pederson RA, 1970 ; Brown et al., 1971 ; Brown JC et Dryburgh, 1971) le GIP est surtout impliqué dans la régulation de la sécrétion de l'insuline par les cellules β du pancréas (Dupré et al., 1973 ; Pederson et al., 1975 ; Creutzfeldt W, 1979 ; Fehmann et al., 1995 ; Tseng et al., 1996 ; Lewis et al., 2000) suite à un repas riche en glucose (Cataland et al., 1974 ; Pederson et al., 1975 ; Tseng et al., 1994 ; Higashimoto et al., 1995), en lipides (Penman et al., 1981 ; Krarup et al., 1985 ; Kwasowski et al., 1985 ; Elliot et al., 1993 ; Higashimoto et al., 1995) ou en protéines (Flatt et al., 1991 ; Wolfe et al., 2000). Le glucose constitue le principal déclencheur de la relâche du GIP chez la plupart des espèces. Cependant, chez l'humain, dont la nutrition est riche en lipides, ces derniers représentent un médiateur beaucoup plus puissant (Falko et al., 1995) quoiqu'à action plus lente (Cataland et al., 1974 ; Brown JC et Otte SC, 1978).

Le GIP est un peptide de 42 acide aminés synthétisé à partir d'un propeptide de 144 acide aminé (Moody et al., 1984 ; Jörnvall et al., 1981 ; Takeda et al., 1987 ; Inagaki et al., 1989 ; Creutzfeldt et al., 1992) dans les cellules K du duodénum (Polak et al., 1973 ; Buchan et al., 1978 ; Schmidt et al., 1997). Le GIP appartient à la famille du glucagon qui comprend, entre autres, le glucagon, le

GLP-1, la sécrétine, le VIP et le PACAP. Tout comme le GLP-1, le GIP stimule la sécrétion de l'insuline en présence de glucose (Anderson et al., 1978). Cependant, de nombreuses évidences suggèrent que le GIP pourrait jouer un rôle beaucoup plus complexe.

1.3.1 Les principales cibles du GIP

Dans les cellules β du pancréas, la principale action du GIP est de stimuler la relâche de l'insuline. L'insuline est une hormone peptidique formée de deux chaînes (A et B) de vingt-et-un et trente acides aminés respectivement, reliés entre elles par l'intermédiaire de deux ponts disulfure. Le rôle majeur de l'insuline est de favoriser l'utilisation des nutriments par la plupart des cellules de l'organisme. Cet effet est médié par un récepteur à activité tyrosine kinase dont le principal substrat est le IRS-1, un médiateur de la voie de la PI3K. Dans la plupart des tissus, l'insuline favorise l'entrée de glucose dans la cellule en augmentant le nombre de transporteurs au glucose à la surface des cellules. Dans le foie, l'insuline augmente également le métabolisme du glucose. La liaison de l'insuline à son récepteur inhibe la PKA ce qui prévient la phosphorylation des enzymes glycolytiques tels que la phosphofructokinase (PFK-1) et la pyruvate kinase (PK) et augmente leur activité. L'insuline stimule aussi la glycogénèse dans ce tissu. La consommation accrue de glucose permet son entrée rapide dans les cellules hépatiques ce qui contribue grandement à diminuer le niveau de glucose dans le sang. Le tissu adipeux joue également un rôle important dans le métabolisme du glucose. Dans ce tissu, l'insuline contribue à la libération des acides gras contenus dans les chylomicrons et les VLDL en augmentant l'expression de la lipoprotéine lipase. Les acides gras sont ensuite captés par les cellules adipeuses où ils serviront à la synthèse des triglycérides (lipogénèse). L'insuline favorise aussi le transport des acides gras dans les cellules musculaires qui les utilisent comme source d'énergie. Lorsque le taux de glucose plasmatique diminue, l'organisme libère le glucagon, qui en stimulant la production d'AMPc par l'intermédiaire de son récepteur couplé aux protéines G, contrecarre les effets de l'insuline.

Dans les cellules β du pancréas, le GIP agit comme facteur de croissance, en synergie avec le GLP-1 et le glucose, effet qui semble principalement médié par l'activation de la PKB et la voie des MAPK (section 1.3.2).

Outre son rôle dans l'homéostasie du glucose, il est récemment devenu apparent que le GIP est impliqué dans le métabolisme des lipides. Un GIPR fonctionnel a été détecté à la surface des cellules adipeuses chez la souris (Yip et al., 1998 ; McIntosh et al., 1999 ; Rupert et al., 2000). De plus, il a été démontré qu'*in vitro*, le GIP augmente l'affinité de l'insuline pour son récepteur et accélère le transport du glucose dans les cellules adipeuses (Starich et al., 1985 ; Hauner et al., 1988). Le GIP agit aussi de manière positive sur la lipogenèse. Tout comme l'insuline, le GIP stimule la sécrétion de la lipoprotéine lipase ce qui permet de libérer plus d'acides gras (Eckel et al., 1979 ; Wasada et al., 1981 ; Ebert et al., 1991 ; Knappel et al., 1994) et favorise leur incorporation sous forme de triglycérides (Yip RGC et Wolfe MM, 2000). De manière contradictoire, le GIP semble également favoriser le catabolisme des lipides. Dans les adipocytes, l'élévation du niveau d'AMPc favorise la lipolyse (Steinberg et al., 1992), effet qui est cependant bloqué en présence d'insuline, par une voie dépendante de la wortmanine (McIntosh et al., 1999). Ces résultats suggèrent que l'effet du GIP sur le métabolisme des lipides puisse être dépendant du contenu des repas. Des études *in vivo* réalisées sur des souris déficientes en GIPR (GIPR^{-/-}) montrent que le GIP stimule directement l'absorption de nutriments par les adipocytes. Lorsqu'elles sont nourries avec une diète riche en gras, ces souris ne développent pas de problème d'obésité, ni de résistance à l'insuline (Miyawaki et al., 2002). Cette observation pourrait s'expliquer, en partie du moins, par le fait que les souris GIPR^{-/-} utilisent préférentiellement les lipides comme source d'énergie afin de compenser leur inefficacité à les emmagasiner.

Le rôle indirect du GIP sur le remodelage osseux par l'intermédiaire de la sécrétion de l'insuline, qui stimule la minéralisation (Verhaeghe et al., 1992 ; Verhaeghe et al., 1997), et de l'amyline, qui inhibe la résorption (Cornish et al.,

1995 ; Cornish et al., 1998 ; Dacquin et al., 2004) a été établi depuis quelque temps déjà. Toutefois, le GIP joue également un rôle direct important dans le contrôle de ce processus. Le remodelage osseux représente l'équilibre entre la résorption et la formation osseuse. Il est régulé par une variété d'agonistes comme les facteurs de croissance (IGF) et les hormones peptidiques (leptine, amyline, insuline). Récemment, le récepteur au GIP a été identifié dans les ostéoblastes, des cellules impliquées dans la formation de l'os (Bollag et al., 2000 ; Bollag et al., 2001), où il diminue l'apoptose et stimule l'activité de l'alcaline phosphatase ainsi que la synthèse du collagène de type I. Les études réalisées par la suite sur les souris GIPR^{-/-} ont permis de confirmer le rôle anabolique du GIP sur le métabolisme osseux (Xie et al., 2005 ; Tsukiyama et al., 2006). Elles ont également permis de démontrer que la perte de la masse osseuse observée chez ces souris est due aussi bien à une augmentation de la résorption osseuse qu'à une perte des ostéoblastes. Cependant, il semble que la santé osseuse de ces souris s'améliore avec le temps, ce qui suggère que des mécanismes compensatoires puissent se développer et prendre le relai.

Chez le chien et le rat, le GIP module le flux sanguin (Kogire et al., 1988 ; Svensson et al., 1997 ; Ding et al., 2004). Dans la veine porte, la liaison du GIP à son récepteur stimule la production d'oxyde nitrique et augmente la circulation sanguine alors qu'elle stimule l'endothéline 1 et la diminution du flux sanguin dans l'artère hépatique. Ce dernier effet du GIP est bloqué lorsque l'élévation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire est inhibée.

Chez le rat, le GIPR est exprimé dans la corticosurrénale et son activation induit la stéroïdogenèse et la production de cortisol. Cet effet semble médié par la PKA puisque le H89, un inhibiteur spécifique, en bloque l'effet (Mazzochi et al., 1999). Chez l'humain, le récepteur est présent dans la zone glomérulée (Lampron et al., 2006a), mais n'est pas couplé à la synthèse du cortisol dans la zone fasciculée, sauf chez les patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Dans le muscle, le GIP promeut le transport du glucose et son oxydation, de même que la synthèse du glycogène, tout comme le fait l'insuline, ce qui suggère que dans ce tissu, le GIPR joue plutôt un rôle de soutien à l'insuline (O'Harte et al., 1998). Cette action du GIP reflète probablement son rôle dans la plupart des tissus.

Le rôle des incrétines, et principalement du GIP, dans le diabète de type II a été le sujet de nombreux débats (Creutzfeldt W et Nauck MA, 1992). Le diabète se caractérise par une incapacité de l'organisme à contrôler efficacement la glycémie, ce qui se traduit par un taux de glucose élevé. Cet état est précédé par une résistance à l'insuline. La résistance à l'insuline est elle-même favorisée par l'obésité (Storlien et al., 1993), le niveau d'insuline circulant plus élevé parmi cette population contribuant à une désensibilisation du récepteur (Karam et al., 1963 ; Yallow et al., 1965 ; Bagdade et al., 1967 ; Kreisberg et al., 1967). Afin de compenser la sensibilité moindre du récepteur à l'insuline, l'organisme produit plus d'insuline, ce qui permet à la glycémie de demeurer normale (Reaven GM, 1988). Cependant, à long terme, le pancréas s'épuise et la résistance à l'insuline est combinée à une perte de la capacité des cellules β à produire de l'insuline. Cela conduit à l'intolérance au glucose et à l'hyperglycémie observée chez les patients diabétiques.

De nombreuses études ont démontré que la sécrétion, de même que l'action du GLP-1, sur la régulation de la relâche de l'insuline ne sont pas altérées chez les diabétiques (Takemura et al., 1981 ; Nauck et al., 1993 ; Elahi et al., 1994 ; Vilsboll et al., 2001 ; Toft-Nielsen et al., 2001). Le niveau de GIP semble également normal, quoique quelques études aient rapporté une modification du niveau de GIP plasmatique chez certains patients (Brown et al., 1975 ; Crockett et al., 1976 ; Ross et al., 1977 ; Creutzfeldt et al., 1980 ; Takemura et al., 1981 ; Salera et al., 1982 ; Elahi et al., 1984 ; Service et al., 1984).

Chez les diabétiques, la réponse au GIP est altérée de manière importante (Krarup et al., 1984 ; Amland et al., 1985 ; Nauck et al., 1986 ; Jorde et al., 1987 ; Jones et al., 1987 ; Krarup et al., 1987 ; Nauck et al., 1993 ; Nauck et al., 1994 ; Fehmann et al., 1995 ; Meiner et al., 2001 ; Vilsboll et al., 2002 ; Gault et al., 2003 ; Gautler et al., 2005). Puisque la sécrétion du GIP semble normale chez ces patients, il est peu probable que la désensibilisation soit responsable de la perte d'activité du récepteur. De même, seules de rares études ont rapporté la mutation du GIPR, soit les mutations faux sens Gly198 → Cys et Glu354 → Gln (Kubota et al., 1996). La présence de polymorphismes dans la région codante du GIPR a également été décrite, mais ceux-ci se sont avérés être présents aussi bien chez les patients que dans le groupe témoin (Almind et al., 1998). Le diabète est une maladie polygénique et il n'est pas exclu que certains de ces polymorphismes constituent un facteur de risque. Toutefois, il ne semble pas représenter un élément essentiel au développement du diabète. L'altération de la réponse au GIP associée au diabète pourrait aussi s'expliquer par une baisse du nombre de récepteurs à la surface cellulaire comme c'est le cas chez le rat diabétique (Lynn et al., 2001). Cette hypothèse reste cependant à confirmer chez l'humain.

Les souris GIPR^{-/-} sont intolérantes au glucose (Scrocchi et al., 1996 ; Scrocchi LA et Drucker DJ, 1998 ; Miyewaki et al., 1999). Cependant, non seulement ces souris conservent leur capacité à stimuler la relâche de l'insuline par le GLP-1, mais elles en produisent plus (Palmir et al., 2003). Un phénomène similaire est d'ailleurs observé avec les souris GLP-1^{-/-} (Pederson et al., 1998), qui produisent plus de GIP, ce qui suggère que l'organisme peut compenser, du moins en partie, la perte de l'action d'une des incrétines. Par contre, les souris qui expriment un dominant négatif du GIPR ont une glycémie plus élevée que les souris GIPR^{-/-}. De plus, ces souris ne sécrètent pas de GLP-1 en excès comme c'est le cas chez les souris GIPR^{-/-}. Cette observation suggère que la présence d'un récepteur endogène, comme c'est le cas chez les diabétiques, pourrait nuire à la mise en place des mécanismes compensatoires.

Puisque l'action du GLP-1 est préservée chez les diabétiques, de nombreuses études se sont concentrées sur la possibilité d'administrer du GLP-1 pour restaurer le métabolisme du glucose chez les patients (Nauck et al., 1993 ; Nauck et al., 1997 ; Rachman et al., 1997 ; Zander et al., 2002 ; Ehlers et al., Meneilly et al., 2003). L'utilisation du GLP-1 possède un avantage majeur ; son action dépend entièrement du glucose ce qui protège l'organisme contre l'hypoglycémie (Qualmann et al., 1995). Cependant, le GLP-1 est rapidement dégradé dans le sang et c'est pourquoi les recherches se sont orientées vers le développement d'un agoniste plus stable (Holst et al., 1999 ; Vilsboll et al., 2003 ; Holst JJ, 2002 ; Fineman et al., 2003). L'administration continue de GLP-1 pourrait toutefois être la solution à ce problème (Deacon et al., 1995 ; Nauck et al., 1996 ; Toft-Nielsen et al., 1999).

La possibilité de retarder la repolarisation de la membrane plasmique à l'aide d'un inhibiteur des canaux potassiques dépendants du potentiel de membrane (section 1.3.2), de même que de bloquer l'action de la dipeptidyl peptidase IV, ont aussi été explorées.

1.3.2 GIP et signalisation intracellulaire

L'action du GIP est médiée par un récepteur couplé aux protéines G, le GIPR (Amiranoff et al., 1984 ; Maletti et al., 1984 ; Amiranoff et al., 1985 ; Maletti et al., 1987 ; Kieffer et al., 1993 ; Yasuda et al., 1994 ; Yamada et al., 1995 ; Volz et al., 1995 ; Gremlich et al., 1995 ; Moens et al., 1996 ; Boylan et al., 1999). Tout comme les autres membres de la famille du glucagon, le GIP lie son récepteur dans un large domaine N-terminal (Jüppner et al., 1994 ; Buggy et al., 1995 ; Gaudin et al., 1995 ; Vilardaga et al., 1995 ; Couvineau et al., 1996 ; Van Eyll et al., 1996 ; Wilmen et al., 1997 ; Gelling et al., 1997). La troisième boucle cytoplasmique et la région C-terminale sont riches en sérine et en thréonine qui représentent des sites de phosphorylation potentiels. Le GIPR est également fortement glycosylé. L'analyse de la séquence du cDNA a permis de démontrer que l'exon 1 est non codant. La traduction commence à un codon

AUG situé dans le deuxième exon. De plus, le GIPR existe sous deux formes de poids moléculaire différent (50 kDa et 60 kDa) (Couvineau et al., 1984 ; Amiranoff et al., 1986) en raison d'une délétion de 27 acides aminés en C-terminal (N'Diaye et al., 1998). Les deux isoformes sont exprimés en proportions égales dans toutes les cellules et aucune différence dans leur capacité à transmettre l'information n'a été observée. Bien qu'aucune donnée ne soit disponible sur la distribution exacte du GIPR chez l'humain, les résultats obtenus chez le rat (Usdin et al., 1993) et les effets physiologiques variés du GIP suggèrent la présence du GIPR dans de nombreux tissus.

Le GIPR est principalement couplé à la voie de l'AMPc (Amiranoff et al., 1984 ; Gespach et al., 1984 ; Siegel Creutzfeld W, 1985 ; Maletti et al., 1987 ; Lu et al., 1993), un médiateur qui stimule la PKA. Grâce à son activité kinase cette enzyme régule l'action de nombreux facteurs de transcription tels que CREB et Sp1. Cependant, la PKA phosphoryle une grande variété de protéines, ce qui peut expliquer que l'activation du GIPR converge également vers d'autres voies de signalisation (Figure 1,13).

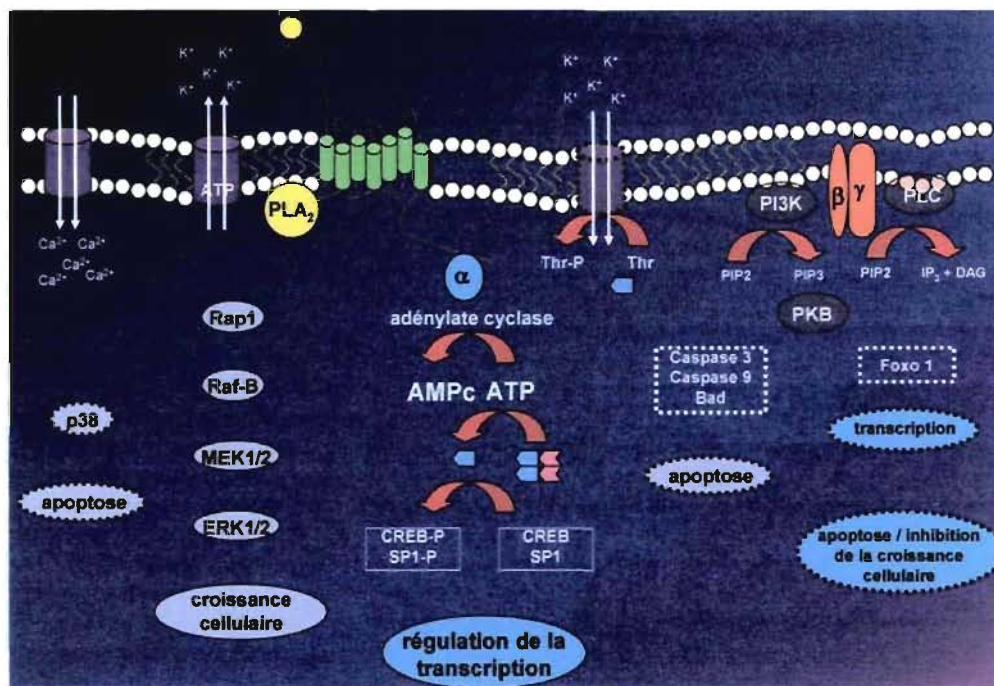


Figure 1,13. GIP et signalisation intracellulaire

Le GIPR ne semble pas couplé à la voie de la phospholipase C (Lu et al., 1993 ; Chabre et al., 1998). La phospholipase C est activée par la sous-unité $\beta\gamma$ (Clapham D et Neer EJ, 1993) du récepteur couplé aux protéines G. Elle est responsable du clivage du phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) et de la production de l'inositol triphosphate (IP₃), qui stimule la relâche du Ca^{2+} contenu dans le réticulum endoplasmique, ainsi que du diacylglycérol (DAG), qui active la PKC. L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire active également la PKC. La sous-unité $\beta\gamma$ et la phospholipase C agissent aussi sur la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) pour former le phosphatidylinositol triphosphate (PIP₃) à partir du PIP₂. L'observation que l'élévation de Ca^{2+} intracellulaire suite à la liaison du GIP à son récepteur ne provient pas des réserves internes de la cellule suggère une action sur l'entrée de Ca^{2+} par l'intermédiaire de canaux calciques (Wahl et al., 1992 ; Lu et al., 1993 ; Miura et al., 1997). Cet effet est médié par le potentiel de membrane. L'activation du GIPR entraîne la fermeture des canaux potassiques sensibles à l'ATP (Louiset et al., 2006). La dépolarisation de la membrane qui résulte de cette action permet l'ouverture des canaux calciques dépendants du potentiel de membrane, ce qui conduit à l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule. Cependant, le GIP seul ne permet pas une hausse importante du Ca^{2+} intracellulaire et cette voie de signalisation est surtout importante lorsqu'elle est combinée au glucose. Dans les cellules β du pancréas, le transport du glucose dans la cellule et son oxydation dans le cycle de Kreb favorise la production d'ATP qui joue alors un rôle bien plus important que le GIP sur l'action des canaux potassiques sensibles à l'ATP (Wahl et al., 1992 ; Habener JF, 1993 ; MacDonald PE et Wheeler MB, 1993 ; Miki et al., 2005). Le GIP joue cependant un rôle de soutien essentiel pour maintenir la dépolarisation de la membrane. En absence de GIP, la dépolarisation de la membrane plasmique entraîne également l'ouverture des canaux potassiques dépendants du potentiel de membrane. Suite à l'ouverture de ces canaux, le potassium entre dans la cellule et repolarise la membrane plasmique ce qui induit la fermeture des canaux calciques. Le GIP, par l'intermédiaire de la PKA prévient cette réponse. La PKA phosphoryle les canaux potassiques dépendants du potentiel

de membrane sur une thréonine du domaine C-terminal ce qui provoque leur endocytose, prévient la repolarisation de la membrane et prolonge l'entrée du Ca^{2+} dans la cellule (Straub SG et Sharp GW 1996 ; Ding WG et Gromada J, 1997 ; Kim et al., 2005a).

Certains gènes possèdent dans leur promoteur un élément de réponse négative au calcium (nCaRE). La transcription des gènes dont le promoteur contient un nCaRE est inhibée lorsque la concentration de Ca^{2+} intracellulaire augmente. L'élément nCaRE (TGAGACAGGGTCTCA), toujours précédé d'une série de thymidine, a été identifié pour la première fois dans le promoteur du gène de la PTH. Par la suite, le nCaRE a été identifié dans le promoteur de plusieurs hormones dont l'ANP et le VIP. Le nCaRE a aussi été trouvé dans le promoteur du gène de l'AP-endonucléase 1 (APEI), des chaînes L et H de la myeloperoxydase et de la sous-unité β de l'ATP synthétase. Bien qu'il soit fréquemment observé dans le promoteur des gènes qui codent pour des hormones, le nCaRE n'a jamais été décrit dans le promoteur des gènes codant pour leur récepteur. Cependant, une analyse informatique du génome à la recherche de séquences nCaRE a montré que cet élément pourrait être présent dans le promoteur du gène qui code pour le récepteur à l'œstrogène. L'élément nCaRE n'a pas encore été complètement caractérisé, mais des études ont montré que la protéine APEI, aussi appelé Ref-1, est capable de lier l'élément nCaRE in vitro en présence du co-facteur hnRPN-L.

Le GIPR est également couplé à la production d'acide arachidonique par la PLA_2 (Eshes et al., 2001 ; Lardinois et al., 1990). La formation d'acide arachidonique se fait pas la digestion des lipides (glycérophospholipides) de la membrane plasmique (Mukharjee et al., 1994). L'effecteur responsable de la stimulation de la PLA_2 varie selon le type cellulaire utilisé. Dans les CHO, il semble que cet effet soit médié par la sous-unité $\beta\gamma$ alors que l'AMPc jouerait un rôle similaire dans les β -TC3. La variation du médiateur en fonction de la cellule pourrait avoir un impact biologique important puisque la réponse est

plus lente lorsque la sous-unité $\beta\gamma$ est impliquée. Par ailleurs, la phospholipase A_2 activé par le GIP est la même que celle qui médie l'effet du glucose (Turk et al., 1987 ; Turk et al., 1993) ce qui suggère que cette voie de signalisation pourrait être importante dans la relâche de la sécrétion de l'insuline.

Plusieurs membres de la famille du glucagon jouent un rôle dans l'activation de la cascade MAPK. C'est le cas notamment du PACAP (Straub et Sharp, 1996 ; Barrie et al., 1997), du glucagon (Jiang et al.), du VIP (Straub et Sharp, 1996) et du GLP-1 (Montrose-Rafizadeh et al., 1999). La cascade MAPK est formée d'au moins trois kinases en série qui culminent par l'activation d'une kinase multifonctionnelle. Il existe au moins cinq modules MAPK chez les mammifères (ERK1/2, p38, JNK/SAPK, ERK3 et ERK5) et ces modules sont principalement associés à la régulation de la prolifération (Garrington et al., 1999 ; Pearson et al., 2001 ; Chen et al., 2001 ; Chang et al., 2001). Les MAPK jouent aussi un rôle dans la réponse au GIP (Kubota et al., 1997 ; Chabre et al., 1998 ; Ehses et al., 2002) par l'intermédiaire de la ERK1/2. À l'origine, ce module a été identifié en raison de son rôle dans la réponse aux récepteurs à activité tyrosine kinase. Cependant, le lien possible entre la ERK1/2 et certains récepteurs couplés aux protéines G a été mainte fois démontré depuis (Marinissen MJ et Gutkind JS, 2001 ; Liebmann C, 2001), de même que le rôle médiateur des principaux effecteurs couplés à ces récepteurs (AMPc, PKC, PI3K, $G_{\alpha s}$, $\beta\gamma$). Par exemple, le récepteur β -adrénergique agit sur la ERK1/2 par l'intermédiaire de la sous-unité $\beta\gamma$ (Daaka et al., 1997 ; Maudsley et al., 2000). La sous-unité $G_{\alpha s}$ peut également interagir avec SRC (Ma et al., 2000), une protéine kinase capable de réguler la ERK1/2 en raison de sa capacité à activer certains récepteurs tyrosine kinase et à influencer l'activité de protéines G monomériques (Maudsley et al., 2000). L'AMPc peut aussi moduler l'activité des MAPK grâce à son action sur les GEFs, de petites protéines capables de favoriser l'échange $GMP \rightarrow GTP$, une étape essentielle à l'activation des protéines G monomériques (Kawasaki et al., 1998 ; Altschuler et al., 1995 ; Ohmstedee et al., 1990 ; Richards JS, 2001). Contrairement à la $G_{\alpha s}$, l'AMPc

peut activer ou inhiber la voie MAPK selon l'isoforme de Raf (A, B ou C) qui est impliqué (Houskay MD et Kolch W, 2000 ; Vossler et al., 1997). Plusieurs évidences suggèrent que l'action du GIP sur la ERK1/2 passe par l'AMPc, qui contribue à l'activation de la Rap1 et la Raf-B. La PKA, qui est elle-même activée par l'AMPc, joue aussi un rôle dans cette cascade en raison de son action répressive sur la fonction de la Raf C et de sa capacité à augmenter l'activité de la Rap1. Cependant, l'inhibition de la PKA ne semble pas modifier l'action du GIP sur la voie MAPK. Il semble que l'action du GIP sur les MAPK soit sensible à la wortmanine, une molécule qui inhibe la PI3K, mais le rôle possible de cette voie de signalisation sur l'action des MAPK par le GIP reste encore à être déterminé. De plus, le GIP semble capable d'inhiber la p38, un module impliqué principalement dans la réponse apoptotique, ce qui suggère que le rôle du GIP est non seulement de promouvoir la prolifération, mais également de prévenir l'apoptose. La répression de la p38 est dépendante du niveau d'AMPc dans la cellule.

La PKB contribue aussi à l'effet anti-apoptotique observé en réponse au GIP (Trümper et al., 2002), un effet médié par la PI3K. La PKB phosphoryle de nombreux facteurs de transcription, dont Foxo 1. Foxo 1 contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la progression des cellules à travers le cycle cellulaire par l'intermédiaire de l'élément de réponse AAAACAAACA. Foxo 1 active également la transcription de gènes directement liés à l'apoptose, comme la protéine Bax. La phosphorylation de Foxo 1 par la PKB séquestre Foxo 1 dans le cytoplasme prévenant ainsi sa liaison à l'ADN. La PKB a aussi la capacité de phosphoryler et de réprimer l'activité de protéines apoptotiques comme les caspases 3 et 9 et Bad. La relâche de l'insuline par le GIP est inhibée par la wortmanine, ce qui suggère que cette voie de signalisation ne jouerait pas seulement un rôle prolifératif dans ces cellules (Straub et al., 1996 ; Straub et al., 1996 b).

Bien que la stimulation de la relâche de l'insuline ne soit possible qu'en présence d'une concentration de glucose qui correspond à l'élévation post-prandiale (10 mM) (Anderson et al., 1978), des études ont démontré que les nombreuses voies de signalisation couplées au GIPR sont activées même à lorsque le glucose se situe à son niveau basale (5 mM) ce qui suggère que le GIP contribue au métabolisme par d'autres actions que celle médiée par l'insuline. Cette action du GIP pourrait être particulièrement importante dans la régulation du métabolisme des lipides considérant que chez l'homme les lipides stimulent la relâche du GIP de manière plus importante que le glucose.

Dans la cellule, la réponse à l'agoniste est généralement rapidement atténuée par une multitude de mécanismes qui impliquent plusieurs des intermédiaires de la cascade métabolique. La transmission du signal peut se terminer par le retrait de l'agoniste qui est dégradé, dilué ou capté par des transporteurs. Dans le cas du GIP, cette action fait intervenir la dipeptidyl peptidase IV qui clive les deux premiers acides aminés en N-terminal (Meintlein et al., 1993 ; Kieffer et al., 1995 ; Meintlein et al., 1999). La désensibilisation homologue ou hétérologue d'un récepteur peut également contribuer à l'arrêt du signal. La désensibilisation homologue du GIPR se fait par l'intermédiaire de la GRK-2, une enzyme capable de phosphoryler le récepteur dans une région impliquée dans la liaison avec la β -arrestine 1. La liaison entre la β -arrestine et le le récepteur entraîne un découplage entre le GIPR et la $G_{\alpha s}$ qui ne peut s'y réassocier. Bien que ce processus soit parfois lié à l'internalisation du récepteur, il ne semble pas que ce soit le cas pour le GIPR (Tseng CC et Zhang XY, 2000) dont l'endocytose survient plutôt suite à la phosphorylation du domaine C-terminal (Wheeler et al., 1999 ; TsengCC et Zhang Xy, 1998). L'endocytose est un processus dépendant des clathrines qui contribue aussi bien au recyclage du récepteur qu'à sa dégradation dans les lysosomes. Cette dernière réponse survient cependant principalement lors d'une exposition prolongée au ligand et joue un rôle important dans la régulation négative. Un peu plus en aval, la RGS-2 influence la transmission du signal par le GIP en agissant de manière à diminuer la demi-

vie de la forme active de la protéine G (Tseng CC et Zhang XY, 1998). De même, l'AMPc est dégradé en 5'AMP par la 3',5'-nucléotide phosphodiesterase. Le récepteur peut aussi subir une désensibilisation hétérologue, un mécanisme qui requièrent généralement la PKA ou la PKC. Au niveau de la régulation de l'expression génique, le GIP est responsable de l'inhibition de la transcription de son propre récepteur, un second mécanisme impliqué dans la régulation négative. Cet effet est médié par la régulation de l'activité de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'activité de son promoteur. Ces facteurs de transcription sont cependant encore inconnus. En physiologie normale, la régulation négative est un processus probablement très rare puisqu'il existe de nombreux mécanismes pour retirer l'agoniste et éviter une exposition prolongée. Toutefois, ce processus présente un grand intérêt dans certaines situations pathologiques, comme la sécrétion continue d'une hormone par une tumeur, ou encore en pharmacologie, dans le développement de nouvelles thérapies (Böhm et al., 1997).

1.3.3 La régulation de l'expression du GIPR

Même si peu de choses sont connues sur les mécanismes qui régulent l'expression du GIPR, quelques études récentes ont mis en évidence le rôle du glucose dans ce processus (Lynn et al., 2003 ; Xu et al., 2007). L'hyperglycémie (10 mM) diminue l'expression du GIPR. Cependant, le temps d'exposition au glucose est important dans cette réponse puisqu'une exposition de courte durée semble plutôt augmenter le niveau d'ARNm du GIPR (Xu et al., 2007). Par ailleurs, une glycémie basale (5 mM) n'a pas d'effet sur le GIPR (Lynn et al., 2003 ; Xu et al., 2007). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas encore connus, ces études ont démontré que le glucose ne diminue pas la demi-vie de l'ARNm ce qui suggère une baisse de l'activité du promoteur.

L'activation du PPAR α (Desvergne B et Wahli W, 1999) par les acides gras tel que le palmitate augmente l'expression du GIPR (Lynn et al., 2003), mais seulement lorsque la glycémie est à son niveau basal. Ceci pourrait s'expliquer,

en partie du moins, par le fait que le glucose diminue l'expression du PPAR α (Roduit et al., 2000) par l'intermédiaire d'un élément de réponse négative au glucose (GRE) contenu dans son promoteur. La signification biologique d'une telle réponse n'est pas claire. Cependant, chez l'homme, les lipides stimulent fortement la relâche du GIP et le GIPR joue un rôle important dans le métabolisme des lipides. Il est possible que la stimulation du PPAR α suite à un repas riche en lipides augmente l'expression du GIPR afin de préparer les cellules à métaboliser efficacement les lipides.

L'insuline semble aussi activer l'expression du GIPR (Lynn et al., 2003) ce qui est cohérent avec le rôle de soutien du GIP sur l'action de l'insuline. Une étude a également montré que la liaison du GIP inhibe l'expression de son récepteur (Tseng et al., 1996). Toutefois, la cascade impliquée dans l'action par ces deux hormones n'a pas encore été identifiée. .

1.4 Régulation de l'expression génique

La cellule est une unité complexe. Pour bien remplir son rôle elle doit réguler de manière rigoureuse le niveau de chacune des protéines qui la composent et s'assurer de maintenir un équilibre. Certaines protéines sont exprimées de manière ubiquitaire, c'est-à-dire que leur concentration ne varie pas ou très peu quels que soient les signaux qui parviennent à la cellule. Toutefois, d'autres protéines doivent être présentes seulement à certains moments précis du cycle cellulaire ou produites en réponse à un stimulus particulier. Le contrôle de leur expression est alors primordial.

1.4.1 Les niveaux de contrôle

1.4.1.1 L'acétylation des histones

Dans le noyau, l'ADN répliquée est immédiatement associée à des protéines histones, qui sont responsables de sa condensation. Les bases azotées ne sont pas impliquées dans l'interaction ADN / histones ce qui permet aux histones d'empaqueter n'importe quelle séquence (Luger et al., 1997), mais implique la

nécessité de requérir à des chaperonnes telles que CAF1, NAP1 ou RCAF pour les escorter jusqu'à leur site d'action (Almouzni et al., 2004).

L'assemblage de l'ADN sous forme de chromatine se fait selon trois niveaux de condensation. Le premier niveau est composé d'un octamère d'histones et d'une région d'ADN d'environ 150 bp. Cette structure appelée nucléosome est formée par l'association d'un tétramère (H3 – H4)₂ central et de deux dimères (H2A – H2B), qui se lient de chaque côté du tétramère, structure autour de laquelle s'enroule l'ADN. L'histone H1 se joint ensuite au complexe et les nucléosomes sont assemblés afin de former la fibre de 30 nm, qui subit elle-même une dernière condensation pour former une unité appelée fibre de 300 nm ou chromosome mitotique. Ces deux dernières étapes requièrent l'énergie de l'ATP (Kornberg et al., 1974 ; Kornberg et Thomas, 1974 ; Luger et al., 1997 ; Ladoux et al., 2000 ; Nagakawa et al., 2001 ; Davey et al., 20002). Les histones associés à l'ADN sont de petites protéines (12 kDa à 60 kDa) composées à plus de 20 % d'acides aminés arginine et lysine, ce qui les place parmi les protéines les plus basiques de la cellule. La composition basique des histones leur permet de former des liens électrostatiques solides avec l'ADN. Des liaisons hydrogène viennent ensuite contribuer à la stabilité de la structure. Les mêmes mécanismes sont chargés de reconstituer la chromatine suite à la réparation des dommages subis par l'ADN.

Chez les eucaryotes, la chromatine existe sous deux formes : l'euchromatine, qui est transcriptionnellement active, et l'hétérochromatine, inactive. Outre les histones, elle contient des protéines non-histones, qui sont impliquées dans sa réplication, sa transcription et sa réparation. Toutefois, avant d'amorcer ces processus, la cellule doit contrecarrer la répression physique par l'intermédiaire du domaine N-terminal des histones, une région qui se trouve à l'extérieur de la structure compacte (Luger et al., 1997). Le domaine N-terminal permet, entre autres, le recrutement de phosphorylase, de méthylase, d'acétylase ou

d'ubiquitinase et même de facteurs de transcription, qui contribuent au remodelage de la chromatine.

La principale modification apportée aux histones est l'acétylation (Figure 1,14). L'acétylation des résidus lysine et arginine masque la charge positive des histones et altère leur interaction avec l'ADN, ce qui permet une ouverture de la chromatine (Wolfe AP et Pruss D, 1996 ; Kuo MH et Allis DC, 1998 ; Tsukiyama T et Wu C, 1997). En plus de modifier les interactions ADN / histones, l'acétylation diminue l'affinité de certains répresseurs pour le nucléosome.

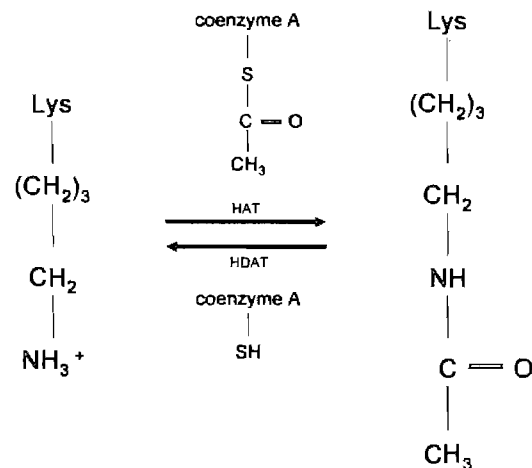


Figure 1,14. Acétylation des histones.

Il existe deux types d'acétylase d'histones (HAT) : les HAT nucléaires et les HAT cytoplasmiques. L'acétylation des histones par les HAT cytoplasmiques survient immédiatement après leur synthèse et a pour fonction de prévenir les interactions non spécifiques durant leur transfert dans le noyau. Les HAT nucléaires contrôlent le remodelage de la chromatine et acétylent les histones en réponse à un signal extracellulaire. Les HAT nucléaires se classent en trois familles principales, les GNAT, les MYST et les protéines reliées à p300/CBP.

La présence d'une activité acétylase d'histones a également été identifiée chez un certain nombre de facteurs généraux de la transcription tel que la TAF_{II}250. Les HAT n'acétylent pas que les histones. De nombreuses évidences montrent que les facteurs de transcription ou leurs cofacteurs peuvent également être acétylés par ces enzymes, ce qui modifie de manière importante leur capacité de liaison à l'ADN ou leur activité. C'est le cas notamment de la p300 qui peut acétyler la TFIIE et la TFIIF (Imhof et al., 1997), de même que la p53, ce qui augmente sa capacité de liaison à l'ADN (Gu W et Roeder RG, 1997).

Le contrôle de la compaction de la chromatine implique la présence d'enzymes capable d'inverser l'acétylation des histones, les désacétylases d'histones (HDAC). Les HDAC peuvent être divisées en trois classes (I, II et III). Les classes I (Gray and Ekstrom, 2001) et II, qui sont sensibles au trichostatin (TSA), sont définies par rapport à leur homologie avec deux HDAC de la levure *S. cerevisiae*, soit la Rpd3 et la HdaI. Les HDAC de classe I sont des protéines nucléaires ubiquitaires capables d'interagir avec une multitude de corépresseurs (Kurdistani and Grunstein, 2003), dont Sin3, NuRD, N-CoR et SMRT (Kadosh and Struhl, 1997; Zhang et al., 1997 ; Zhang et al., 1998), mais également avec plusieurs complexes de remodelage à activité ATPase (SWI/SNF, ISWI, INO et CHD) (Almouzni et al., 2004). Les HDAC de classe II sont spécifiques à certains tissus et sont localisées aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Verdin et al., 2003). La classe III est définie en fonction de son homologie de séquence avec Sir2, une HDAC de la levure *S. cerevisiae* dépendante du NAD⁺ (Blander and Guarente, 2004).

En plus de l'acétylation de ces résidus lysine et arginine, l'histone H2A est phosphorylé sur des résidus sérines localisés dans le domaine C-terminal, un mécanisme principalement impliqué dans la signalisation des dommages à l'ADN (Rogakou et al., 1998 ; Allard et al., 2004; Peterson and Cote, 2004). La phosphorylation peut également avoir lieu sur d'autres histones, qui peuvent aussi subir la méthylation ou l'ubiquitination. Les modifications de la région N-

terminale ne sont pas mutuellement exclusives et pourraient former un code qui serait reconnu et traduit par certaines protéines à travers les divisions cellulaires créant ainsi une marque épigénétique.

1.4.1.2 La méthylation de l'ADN

Au niveau de l'ADN, la méthylation (Lewis J et Bird A, 1991 ; Kass SU et al., 1997) joue un rôle important dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle. Elle procure à la cellule un moyen simple de prévenir l'expression d'un gène même si les facteurs de transcription impliqués dans son expression sont présents dans la cellule. Les régions méthylées sont transcriptionnellement inactives, car elles lient des protéines de liaison à l'ADN méthylé (MeCP1/2) (Meehan et al., 1989) qui peuvent recruter des protéines à activité désacétylase d'histones, de même que des corépresseurs tel que Sin3A (Nan et al., 1998) qui condensent l'ADN. Elles empêchent également la liaison de facteurs de transcription activateurs (Newell-Price et al., 2000). Parmi ces facteurs, il y a CREB (TGACGTCA) (Iguchi-Arigo SM et Schaffner W, 1989), Sp1 (GGCGGG) et le facteur de liaison du rétinoblastome (AGCTGCCGCGGGCGGAAGT) (Ohtani-Fujita et al., 1993).

Dans la plupart des cellules eucaryotes, environ 5 % des résidus cytosine qui sont suivis d'une guanine sont méthylés. Le regroupement de ces résidus dans certaines régions particulières du génome est connu sous le nom d'îlots CpG. Pour qu'une région d'ADN soit considérée comme un îlot CpG, le contenu en nucléotides C et G doit être supérieur à 60 % et le ratio CpG observé / CpG attendu doit être d'au moins 0 : 6. Les îlots CpG sont présents dans la région promotrice des gènes, mais l'exon 1 est aussi fréquemment méthylé (Bird A, 1992). Leur taille moyenne est d'environ 500 bp à 1000 pb (Gardiner-Garden M et Frommer M, 1987) et la densité de CpG méthylés qui s'y trouve est importante. Un promoteur faible sera inhibé par la présence d'une faible méthylation alors qu'un promoteur fort requerra une plus grande concentration de CpG pour être complètement inhibé (Boyes J et Birol A, 1992). Par ailleurs,

bien que les CpG isolés, qui sont dispersés à travers le génome, soient habituellement méthylés, les îlots CpG sont généralement protégés de la méthylation. Il y a cependant des exceptions à cette règle comme l'inactivation d'un des chromosomes X chez la femme (Riggs AD et Pfeifer GP, 1992). La régulation de l'expression des gènes H19 et IGF-II par empreinte génétique implique également la méthylation d'un large îlot CpG (Sasaki et al., 2000). Par ailleurs, le rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression d'un nombre croissant de protéines spécifiques à certains tissus commence à être étudié. Par exemple, le promoteur de la LDH-C (lactate déshydrogénase) humaine (Bonny C et Goldberg E, 1995) est méthylé différemment selon que les tissus. C'est aussi le cas de l'histone H2B chez les rongeurs (Choi YC et Chae CB, 1991 ; Choi et al., 1996), de même que du précurseur POMC (Newell-Price et al., 2001).

1.4.1.3 Les facteurs de transcription

Chez les eucaryotes, la régulation de la transcription procure à la cellule un moyen efficace de répondre aux signaux qui proviennent de l'environnement. La transcription d'un gène en ARNm mature requiert plusieurs étapes (assemblage du complexe d'initiation de la transcription, activation du complexe d'initiation de la transcription, élongation du transcrit, terminaison de la transcription et maturation de l'ARN) qui représentent autant de points de contrôle. Cependant, l'initiation de la transcription par les facteurs de transcription est l'étape clé de ce processus.

Les facteurs de transcription se divisent en trois catégories : les facteurs de la machinerie transcriptionnelle de base (TF_{II}, TAFs), nécessaires à la transcription de tous les gènes, les facteurs de transcription ubiquitaires (Sp1, CREB, jun/fos, Oct-1, Egr, ZBP89, Smad ; GR), impliqués dans la régulation de nombreux gènes, et les facteurs de transcription spécifiques à certains tissus (SF-1, Pit-1 ; MyoD ; Cbfa-1) exprimés uniquement dans certaines cellules. Malgré ces différences, les facteurs de transcription ont tous un point en commun ; ils

possède un domaine de liaison à l'ADN et un domaine activateur / répresseur (Figures 1,15 et 1,16) (Ptashne M., 1988 ; Mitchell PJ et Tjian R, 1989).

Les domaines de liaison à l'ADN sont regroupés en quatre classes : le motif à doigt de zinc, l'homéodomaine, le motif à leucines et le motif à acides aminés basiques. D'abord identifié dans la TF_{II}A, le motif à doigt de zinc est fortement répandu. Il existe sous deux formes qui se distinguent par les acides aminés impliqués dans la liaison avec l'ion zinc. Dans sa forme classique, le doigt de zinc consiste en une séquence de trente acides aminés parmi lesquels se trouvent deux cystéines et deux histidines, qui stabilisent le domaine en interagissant avec un ion zinc (Cys₂/His₂). Ce motif est habituellement répété en tandem et une région d'environ douze acides aminés sépare chacun des motifs. Ce type d'arrangement est caractéristique du facteur de transcription Sp1, qui possède trois de motifs Cys₂/His₂ dans son domaine de liaison à l'ADN.

Le doigt de zinc peut également être formé de deux paires de cystéines (Cys₂/Cys₂). Les facteurs de transcription qui possèdent ce motif lient souvent l'ADN sous forme de dimère, sur un élément de réponse palindromique. Le récepteur aux glucocorticoïdes (AGAACA ; IR3) est un récepteur nucléaire à motif doigt de zinc. Les récepteurs nucléaires, des facteurs de transcription particuliers dont l'action est médiée par un ligand, possèdent d'ailleurs souvent un domaine de liaison à l'ADN Cys₂/Cys₂. Les autres acides aminés qui composent le doigt de zinc sont très variables, ce qui explique que chaque facteur de transcription possède sa propre séquence de reconnaissance (Mader S et al., 1989).

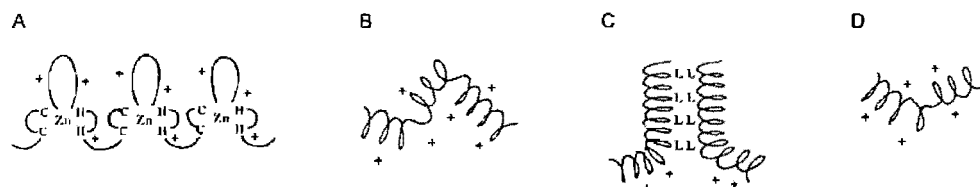


Figure 1,15. Les domaines de liaison à l'ADN. A) Motif à doigt de zinc B) Homéodomaine C) Motif à leucines D) Motif à acides aminés basiques (Mitchell PJ et Tjian R, 1989).

L'homéodomaine (Scott et al., 1989 ; Levine M et Hoey T, 1988) est surtout connu pour sa présence dans les protéines régulatrices de l'embryogenèse chez le drosophile. Ce domaine de soixante acides aminés, qui ressemble également au motif hélice/tour/hélice observé dans les répresseurs procaryotes, a pourtant été identifié dans le domaine de liaison à l'ADN de nombreux facteurs de transcription ubiquitaires (Oct-1/2) (Ko et al., 1988 ; Scheidereit et al., 1988 ; Clerc et al., 1988) et spécifiques (Pit-1) (Ingraham HA et al., 1988) chez les vertébrés.

Le motif à leucines comprend une région de trente acides aminés, qui se caractérise par une hélice α formée par l'alternance de résidus à charge nette positive et de résidus leucine. Au nombre de quatre, les résidus leucine sont positionnés tous les sept acides aminés, ce qui leur permet d'être localisé à l'extérieur de l'hélice et de créer un point de contact hydrophobe. Bien qu'il forme le domaine de liaison à l'ADN, le motif à leucines est également impliqué dans la dimérisation des facteurs de transcription puisque les interactions hydrophobes entre les résidus leucine stabilisent le dimère. Les résidus basiques sont nécessaires à la liaison spécifique avec l'ADN. Le motif à leucine est présent, entre autres, dans le domaine de liaison à l'ADN des facteurs de transcription C/EBP (Landschulz et al., 1988) et jun/fos (Kouzaride T et Ziff E, 1988 ; Turner R et Tjian R, 1989).

Tout comme le motif à leucine, le motif à acides aminés basiques forme une hélice α . Cependant, aucun résidu hydrophobe ne s'intercale entre les résidus basiques. Les facteurs de transcription tels que CTF et NF-I (Paonessa et al., 1988) possèdent un domaine de liaison à l'ADN à acides aminés basiques.

Les domaines impliqués dans l'activation de la transcription (Mitchell PJ et Tjian R 1989) sont formés par des régions d'environ trente à cent acides aminés, séparées du domaine de liaison à l'ADN. La plupart des facteurs de

transcription possèdent plus d'un domaine activateur et ces domaines n'appartiennent pas toujours à la même famille (Figure 1,16).

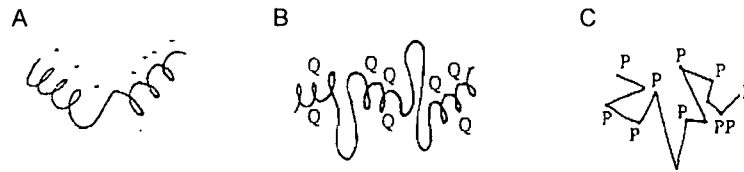


Figure 1,16. Les domaines activateurs. A) Domaine à acides aminés acides B) Domaine riche en glutamines C) Domaine riche en proline (Mitchell PJ et Tjian R, 1989).

Le premier domaine activateur à être identifié fut le domaine à acides aminés acides présents dans GAL4. Ce domaine est caractérisé par de petites séquences riches en résidus acides, qui sont chargés négativement à pH physiologique. Ces résidus s'assemblent pour former des hélices α bipolaires qui ne présentent aucune autre similarité de séquence.

Le deuxième domaine activateur, le domaine riche en glutamines, est présents dans de nombreux facteurs de transcription (Sp1, Oct-1/2, SRF), de même que chez plusieurs récepteurs nucléaires (androgènes, glucocorticoïdes). Il est formé d'une région dont au moins 25 % des acides aminés sont des glutamines. Cependant, comme pour le domaine à acides aminés acides, aucune autre homologie de séquence n'est observée entre les différents motifs riches en glutamines.

Le domaine riche en prolines est similaire au domaine riche en glutamines, mais les résidus glutamine sont remplacés par des prolines. Il est présent chez des facteurs de transcription tels que CTF/NF-1 (Mermod et al., 1989), de même que dans le domaine activateur de nombreux récepteurs nucléaires (androgènes, minéralocorticoïde).

Les domaines activateurs de différents facteurs de transcription peuvent interagir entre eux (synergie) de même qu'avec la machinerie transcriptionnelle de base, ce qui explique qu'ils puissent favoriser l'initiation de la transcription.

Outre les domaines de liaison à l'ADN et activateurs, les facteurs de transcription possèdent des sites de phosphorylation qui modulent leur action sur la transcription. Le facteur de transcription CREB par exemple est activé lorsqu'il est phosphorylé par la PKA. La glycosylation est une autre forme de modification post-traductionnelle qui modifie l'activité des facteurs de transcription. Tout comme la phosphorylation, la glycosylation survient sur les résidus sérines et thréonines, ce qui suggère que les mêmes résidus sont susceptibles de subir ces deux modifications dont l'effet pourrait être opposé. La glycosylation pourrait également jouer un rôle dans la dégradation des protéines. Par ailleurs, la localisation cellulaire (cytoplasme / noyau) est aussi un mécanisme qui permet de réguler la transcription.

1.4.1.4 Les autres points de contrôle

Les facteurs de transcription contribuent à l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription (section 1.4.2). Une fois la machinerie transcriptionnelle de base assemblée, la synthèse du transcrit peut s'amorcer. Pour la polymérase à ARN II, la transition entre l'initiation et l'élongation exige la phosphorylation du domaine C-terminal (CTD). Le domaine CTD est formé par la répétition d'un heptapeptide (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser). La phosphorylation des résidus sérine / thréonine de l'heptapeptide par la TF_{II}H sert de signal pour amorcer l'élongation de la chaîne ARN. À ce moment, la TF_{II}D et la TF_{II}A demeurent liés au site d'initiation de la transcription alors que les TF_{II}B, TF_{II}E et TF_{II}H quittent le complexe. Seules la polymérase à ARN II et la TF_{II}F participent à l'élongation du brin d'ARN (Zawel L et Reinberg D., 1992 ; Roeder RG, 1996 ; Orphanides et al., 1996).

La maturation de l'ARN requiert l'ajout de la coiffe en 5', une modification qui survient rapidement après l'initiation de la transcription et qui permet le transport des ARNs vers le cytoplasme. L'ajout de la coiffe requiert l'hydrolyse du phosphate γ sur le premier nucléotide par une triphosphatase à ARN. Un groupement GMP est ensuite lié sur le diphosphate par une guanylyltransférase à ARN puis la guanine-7-méthyltransférase à ARN ajoute un groupement méthyle en position 7 de la guanine. Chez les vertébrés, le ribose des deux premiers nucléotides est également méthylé sur l'hydroxyle en position 2' (Figure 1,17 A).

La terminaison de la transcription par la polymérase à ARN II requiert un signal pour la polyadénylation, un remaniement consiste à ajouter une série de cent à deux cent cinquante résidus adénylate. Cette structure, la queue poly A, protège l'extrémité 3' du transcrit de la dégradation enzymatique. L'ajout de la queue poly A commence par la formation d'un groupement hydroxyle 3' libre, sur le site poly A qui borde le dernier exon, une action catalysée par une endonucléase. Puis la poly (A) polymérase procède à l'ajout des résidus adénylate. Cet enzyme ne nécessite pas d'amorce et ajuste de lui-même le nombre d'adénosines qui sont requises (Figure 1,17 B) (Hirose Y et Manley JL, 2000).

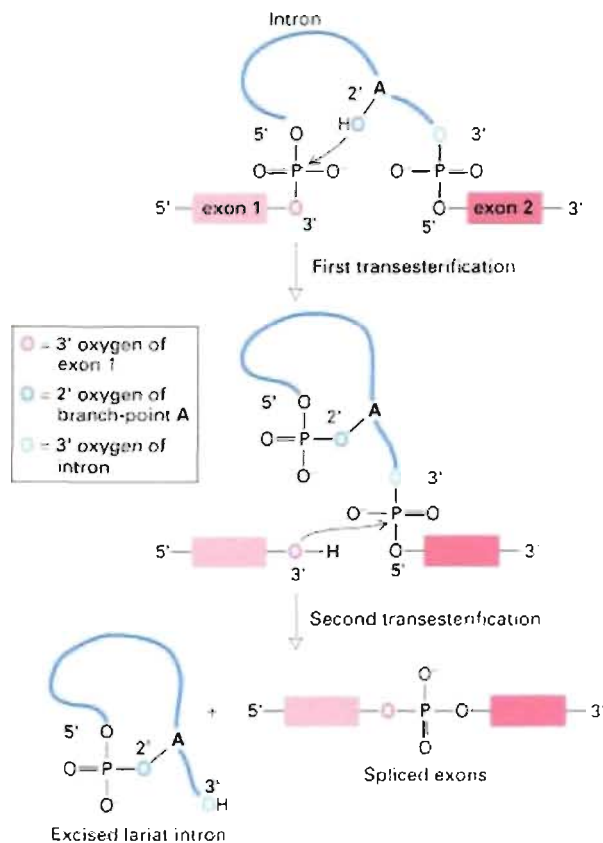


Figure 1,18. Épissage des introns (Lodish H et al., 1997).

En plus de réguler le processus transcriptionnelle, la cellule exerce un contrôle sur la synthèse des protéines, de même que sur leur activité. Dans certaines situations, la cellule peut bloquer l'initiation de la traduction, une action qui explique qu'il soit parfois possible d'observer une incohérence entre le niveau d'ARNm et le niveau de protéines. Par ailleurs, la cellule a développé des mécanismes de modification post-traductionnelle, capables de réguler l'activité protéique, comme la phosphorylation et la glycosylation. La liaison d'un ligand peut aussi influencer l'activité d'un enzyme. Dans ce cas, la disponibilité du substrat représente un autre point de contrôle.

1.4.2 Transcription basale des promoteurs TATA

Lors de l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle de base, la TBP est la seule à pouvoir lier l'ADN à un site appelé boîte TATA. La boîte TATA est ainsi nommée en raison de sa séquence consensus TATAT/AAT/A et est localisée à environ trente nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Une fois liée à l'ADN, la TBP s'associe à d'autres sous-unités protéiques, les TAFs, pour former la $TF_{II}D$. Chez les eucaryotes, la $TF_{II}D$ est composée de la TBP et d'au moins huit TAFs (Dynlacht et al., 1991 ; Tanese et al., 1991 ; Zhou et al., 1992). Ce complexe contient des peptides qui contribuent à l'initiation de la transcription en servant de pont entre la machinerie transcriptionnelle de base et les facteurs de transcription (Pugh BF et Tjian R, 1990 ; Pugh BF et Tjian R, 1991 ; Tanese et al., 1991 ; Zhou et al., 1992). Par ailleurs, la $TF_{II}D$ recrute les autres TF_{II} afin d'assembler le complexe d'initiation de la transcription. Elle possède également une activité acétylase et kinase, qui permet le remodelage de la chromatine. La $TF_{II}A$ est la suivante à se joindre au complexe. Sa fonction principale est de stabiliser la liaison de la TBP et les interactions entre les TAFs afin de prévenir la dissolution précoce du complexe d'initiation de la transcription. La $TF_{II}D$ recrute aussi la $TF_{II}B$ qui est elle-même nécessaire à la liaison de la $TF_{II}F$. Ensemble, la $TF_{II}B$ et la $TF_{II}F$ vont recruter au site d'initiation de la transcription la polymérase à ARN II, un complexe de douze sous-unités. La $TF_{II}E$ et la $TF_{II}H$ peuvent alors se joindre au complexe. La $TF_{II}E$ possède une activité APTase et kinase qui lui permet de moduler l'activité hélicase de la $TF_{II}H$ et de promouvoir la séparation des brins d'ADN alors que la $TF_{II}H$ possède une activité hélicase qui contribue au déroulement de l'ADN et à la progression du complexe.

Les facteurs de transcription jouent aussi un rôle important dans l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle de base en stabilisant les interactions entre les TF_{II} et en accélérant la formation du complexe. Les facteurs de transcription agissent par l'intermédiaire de TAFs spécifiques. Les facteurs de transcription à domaines riches en glutamines tels que Sp1 lient la $TAF_{II}130$ et la $TAF_{II}55$

(Hoey et al., 1993 ; Gill et al., 1994) alors que les facteurs de transcription qui possèdent un domaine activateur riche en acides aminés acides (p53, VP16) interagissent plutôt avec la TAF_{II}32 et la TAF_{II}70 (Tanese N et al., 1991 ; Goodrich et Tjian, 1994). Cette observation explique, du moins en partie, l'effet de synergie exercé par certains facteurs de transcription *in vivo*. L'association de facteurs de transcription capables de former des liens avec des TAFs différentes permet d'augmenter le nombre de contacts avec la machinerie transcriptionnelle de base et de favoriser la stabilité du complexe (Sauer et Tjian, 1997). Les TAFs pourraient également jouer un rôle dans la régulation de l'expression spécifique de certains gènes. C'est le cas notamment de la TAF_{II}105 qui est présente uniquement dans les cellules immunitaires de type B (Dikstein et al., 1996).

1.4.3 Transcription basale des promoteurs sans boîte TATA

Au départ, les promoteurs sans boîte TATA étaient décrits comme constitutif (gènes d'entretien). Cependant, les nombreuses données accumulées depuis montrent que l'expression de ces gènes est régulée exactement comme celle des gènes à promoteur TATA. Les oncogènes (c-myb et TGF- α), les facteurs de croissance (FGF et IGF-II), les récepteurs (EGFR et NGFR) et les facteurs de transcription (Sp1) peuvent tous posséder des promoteurs sans boîte TATA.

Dans les promoteurs sans boîte TATA, la TBP est incapable de se lier à l'ADN, ce qui implique que d'autres protéines sont nécessaires pour recruter la TF_{II}D et les facteurs de la machinerie transcriptionnelle de base. Ces protéines reconnaissent une région d'ADN appelée Inr. Contrairement au consensus TATAT/AAT/A, la séquence Inr est variable et peut être reconnue par plus d'une protéine ce qui complique l'étude de ces promoteurs.

La majorité des Inr (Azizkhan et al., 1993) englobe le site d'initiation de la transcription qui est généralement formé du dinucléotide CA. Ils sont regroupés en famille selon l'homologie de leur séquence consensus. Le premier Inr

(ATTTCGCGCCAAACTT) a été identifié dans le promoteur du gène de la dihydrofolate réductase (DHFR). Une séquence similaire a ensuite été observée dans le promoteur des gènes de l'hypoxanthine, de la phosphoribosyltransférase et de la 3-phosphoglycérate kinase, de même que dans le promoteur du virus SV-40. La principale protéine connue pour lier l'Inr DHFR est le facteur E2F (Means A et Farnham P, 1990 ; Blake MC et Azizkhan JC, 1989). Cependant, l'analyse de la séquence nucléotidique des promoteurs de la famille DHFR a révélé la présence de nombreux sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 également nécessaire à la transcription basale (section 1.4.3.1). Bien que le mécanisme impliqué soit encore inconnu, la possibilité d'une interaction entre E2F et Sp1 a été démontrée (Lin et al., 1996) ce qui suggère que Sp1 pourrait lier la machinerie transcriptionnelle de base par l'intermédiaire de E2F et ainsi contribuer à stabiliser le complexe initiateur. L'initiateur YY1 (AANATGGN(G/C) peut aussi interagir avec le facteur de transcription Sp1 (Lee et al., 1993 ; Seto et al., 1993), mais contrairement à E2F, YY1 peut agir comme régulateur positif ou négatif (Lee et al., 1993).

Un élément Inr a aussi été identifié dans le promoteur du gène de la Tdt (CTCATTCT). Cet élément de réponse (CTCANTCTCT), observé par la suite dans le promoteur des gènes codant pour le RAR α et le facteur de transcription CREB, peut recruter plusieurs protéines (TFII, USF, CBP). Certaines de ces protéines sont également capables de lier d'autres consensus. Le facteur USF, entre autres, interagit de manière spécifique avec la séquence CACGTG. Le promoteur du gène qui code pour le PBGD contient aussi un consensus similaire à celui des membres de la famille Tdt (CTCATCCTGGTTAC), mais la protéine qui s'y lie n'a pas encore été identifiée (Beaupain et al., 1990).

Les éléments Inr décrits ci-dessus sont les principaux éléments de réponse observés dans les promoteurs sans boîte TATA. Cependant, de nombreux autres gènes dont le promoteur ne contient pas de boîte TATA initient leur transcription à un site « autre », ce qui rend difficile l'étude des Inr sur la base

de l'homologie de leur séquence. Les protéines ribosomales par exemple amorcent leur transcription sur une cytosine localisée à l'intérieur d'un site riche en pyrimidine (⁴CTTCCCTTTTCC⁺⁸) qui ne contient pas le dinucléotide CA (Hariharan N et Perry RP (1990). En outre, la boîte CCAAT, située entre 40 bp et 100 bp du site d'initiation de la transcription, peut également remplacer la boîte TATA pour l'assemblage de la machinerie transcriptionnelle de base. Cet élément de réponse capable de lier le facteur C/EBPa, peut être suffisant (β-globin) ou agir en combinaison avec les facteurs de transcription Sp1 (thymidine kinase).

1.4.3.1 Facteurs de transcription de la famille Sp / KLF

Un grand nombre de promoteurs sans boîte TATA possèdent une région promotrice proximale riche en nucléotides G et C, région dans laquelle une ou plusieurs boîtes GC / CACCC peuvent être identifiées. Ces séquences sont ainsi nommées en raison de leur séquence particulière (GGGCGG et GGTGTGGGG). Elles peuvent lier les facteurs de transcription de la famille Sp / KLF (Suske G, 1999).

Sp1 est le premier membre de cette famille à avoir été identifié et purifié (Kadonaga et al., 1987) en raison de sa présence dans le promoteur du virus de l'immunodéficience du singe SV-40 (Dyran WS et Tjian R, 1983) et de son rôle important dans l'activation de la transcription. Chez les mammifères, l'élément de réponse pour le facteur de transcription Sp1 a d'abord été identifié dans le promoteur du gène de la thymidine kinase (Jones et al., 1985) puis dans celui de la dihydrofolate réductase (Karlseder et al., 1996 ; Lin et al., 1996 et Zwicker et al., 1996). Depuis, le facteur de transcription Sp1 a été associé à la régulation de nombreux gènes impliqués dans de multiples fonctions, dont les gènes d'entretien, les oncogènes (TCL-1, c-myb, TGFα), les gènes impliqués dans la croissance cellulaire (FGF, IGF-II, EGFR, NGFR) et même les facteurs de transcription (Sp1). Les membres de cette famille ne sont pas exprimés chez les invertébrés.

Sp1 se lie principalement à la séquence consensus GGGCGG, mais peut également lier, avec une affinité moindre, des séquences atypiques qui sont des variantes de cette séquence à l'intérieur de laquelle un ou deux nucléotides sont modifiés. Par exemple, l'affinité de Sp1 pour les séquences GGGTGG et GGGAGG est respectivement trois et six fois inférieure à celle de la séquence classique alors que la liaison est pratiquement impossible sur la séquence GGGGGG (Letovsky J et Dynan WS, 1989 ; Kadonaga et al., 1986). Par ailleurs, même la boîte GC classique n'est pas liée avec la même affinité dans tous les promoteurs puisque les nucléotides situés de chaque côté peuvent également avoir un effet sur la capacité de liaison de Sp1. Les nucléotides situés de chaque côté du consensus pourraient également jouer un rôle dans le recrutement de cofacteurs spécifiques.

Bien qu'asymétrique les éléments de réponse GGGCGG et GGGTGG fonctionnent dans les deux sens. De plus, bien que ce consensus puisse être retrouvé en une seule copie, la plupart des promoteurs possèdent plusieurs boîtes GC / CACCC. La plupart du temps, celles-ci se situent dans les 100 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Cependant, certains sites peuvent être retrouvés jusqu'à 500 pb du nucléotide +1. Dans les promoteurs qui contiennent plusieurs boîtes GC / GT, la distance entre les boîtes GC / GT et le site d'initiation de la transcription de même que le nombre de ces boîtes sont importants à l'activité du promoteur. Le contexte du promoteur est également important dans l'effet de synergie. Dans le promoteur du virus SV-40 les six sites Sp1 adjacents fonctionnent indépendamment les uns des autres alors que dans plusieurs promoteurs les sites multiples travaillent en synergie.

Le facteur de transcription Sp1 possède un domaine de liaison à l'ADN à motif doigt de zinc situé dans la région C-terminale (Figure 1,19) (Kadonaga JT et al., 1988). La région N-terminale contient deux domaines activateurs (AD) riches en glutamines (A et B) (Courey AJ et Tjian R, 1988 ; Kadonaga JT et al., 1988 ; Courey et al., 1989 ; . Pascal et Tjian, 1991). Ces domaines sont impliqués

dans liaison avec la TAF_{II}130, de même que dans la multimérisation, un processus qui requiert préalablement la liaison à l'ADN (Pascal et al., 1991). Un domaine riche en résidus sérine / thréonine précède chacun des domaines activateurs. Ces résidus représentent des sites de phosphorylation potentiels qui pourraient jouer un rôle important dans la régulation de l'activité de Sp1. L'effet de synergie observé dans certains promoteurs est principalement médié par le domaine D, une région impliquée dans l'interaction entre Sp1 et la TAF_{II}55. Un rôle dans l'effet de synergie a également été attribué au domaine C, et plus particulièrement au domaine Btd, entouré de deux régions fortement chargées. Par ailleurs, la boîte Sp (N-terminal) et les deux séquences PEST (C-terminal) pourraient jouer un rôle dans la régulation de la dégradation par les protéasomes

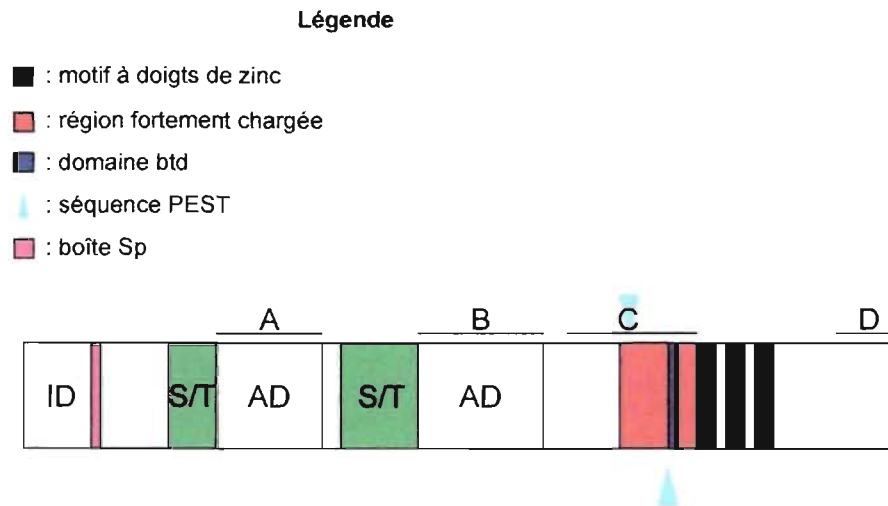


Figure 1,19. Facteur de transcription Sp1.

La phosphorylation est une des modifications post-traductionnelle les plus importantes (Samson SLA et Wong NCW, 2002). Elle peut modifier l'affinité des facteurs de transcription pour leur séquence consensus (augmenter ou diminuer), changer leur localisation cellulaire ou encore influencer les interactions protéines / protéines (favoriser ou inhiber).

Le facteur de transcription Sp1 possède de nombreux sites de phosphorylation qui sont spécifiques pour des kinases particulières. De même, la phosphorylation de ces résidus n'affecte pas l'activité de Sp1 de manière identique. La caséine kinase II, une sérine / thréonine kinase ubiquitaire, phosphoryle la thréonine 579 à l'intérieur du motif à doigt de zinc ce qui diminue l'affinité de Sp1 pour sa séquence de reconnaissance (Armstrong et al., 1997). Un traitement avec le TPA, qui régule positivement la PKC, diminue également la liaison de Sp1 à l'ADN alors que la cdk2 a l'effet inverse. La phosphorylation du domaine B (thréonine 366) par la PKA agit de manière positive sur l'activité de Sp1, en contribuant à la multimérisation (Rohlf et al., 1997). Un effet activateur est aussi observé suite à la phosphorylation du domaine riche en glutamine par une protéine kinase dépendante de l'ADN (Jackson et al. 1990), de même que par la phosphorylation des thréonines 453 et 739 par la p38 (D'Addario et al., 2006). De manière similaire, la cascade MAPK module Sp1 par l'intermédiaire de la ERK1/2 (Merchant et al., 1999). Par ailleurs, la phosphorylation de Sp1 pourrait expliquer l'effet activateur du glucose sur la transcription de certains gènes glycolytiques comme ceux de l'aldolase A et de la pyruvate kinase M2 (Daniel et al., 1996).

Dans la cellule, une partie du glucose (2 % à 6 %) converge vers la biosynthèse des hexoamines, un processus impliqué dans la glycosylation des protéines. La glycosylation consiste à lier un N-acétylglucosamine monomérique sur un résidu sérine ou thréonine. Cette réaction est catalysée par la O-linked GlcNAc transférase (OGT) qui utilise l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) comme substrat. Les premières protéines glycosylées à être identifiées étaient des protéines cytosoliques. Cependant, de nombreuses protéines nucléaires, dont les facteurs de transcription, sont glycosylées.

Le facteur de transcription Sp1 possède au moins huit sites de glycosylation. Puisque les résidus glycosylés sont les mêmes que ceux qui sont phosphorylés (Chou et al., 1995), la glycosylation joue probablement un rôle important dans

la régulation de l'activité transcriptionnelle de Sp1. Cet effet peut être médié par la modification des interactions Sp1 / Sp1 ainsi que les interactions Sp1 / protéines et en particulier avec les peptides de la machinerie transcriptionnelle de base (Roos et al., 1997). La glycosylation pourrait également prévenir la multimérisation de Sp1 en absence de liaison spécifique avec l'ADN et jouer un rôle dans la dégradation par les protéosomes.

Les embryons Sp1^{-/-} ont un développement embryonnaire retardé, ne survivent pas plus de dix jours et possèdent de nombreuses anomalies phénotypiques (Merin et al., 1997). Ces anomalies seraient principalement dues à la répression du gène codant pour la MeCP2, une protéine qui lie l'ADN méthylé et inhibe la transcription. Les souris qui n'expriment pas la MeCP2 meurent au onzième jour de gestation et présentent un phénotype très semblable à celui observé chez les souris Sp1^{-/-} (Tate et al., 1996). Durant les dix premiers jours du développement, les cellules de l'embryon prolifèrent puis amorcent leur différenciation. Considérant la panoplie de gènes régulés par Sp1 et leur rôle dans ces deux processus, il semble que d'autres membres de la famille Sp1 / KLF soient capables de compenser l'absence de Sp1 au cours de cette période. Sp3, un facteur de transcription ubiquitaire qui lie également la boîte GC, est un candidat intéressant pour remplir cette fonction. La mort des embryons au dixième jour suggère un rôle essentiel pour Sp1 dans le maintien de la différenciation cellulaire et la survie des cellules non croissantes, fonction qui ne pourrait être remplie par les autres membres de la famille. Il est possible qu'à partir de ce stade, le niveau d'expression de ces protéines ne soit tout simplement plus assez élevé pour accomplir cette tâche ou encore que leur activité soit modifiée. Il a notamment été démontré qu'au début de l'embryogenèse, le ratio Sp3 / Sp1 est particulièrement élevé puis qu'il s'inverse lors de la différenciation cellulaire (Saffer et al., 1990). C'est le cas, entre autres, dans les kératinocytes où le niveau de Sp3 chute lors de la différenciation. Chez les souris Sp1^{-/-}, la baisse du niveau de Sp3 dans la cellule au cours de cette période l'empêcherait de compenser l'absence de Sp1 et

provoquerait la mort des embryons. De même, le facteur de transcription Sp3 est activateur ou répresseur selon le contexte. Les facteurs qui influencent ce changement ne sont pas encore connus, mais pourraient être présents à certains stades du développement embryonnaire.

Sp1 joue également un rôle direct au niveau de la méthylation de l'ADN. Dans les îlots CpG, la liaison de Sp1 à son site de reconnaissance (GGGCGG) prévient la méthylation de l'ADN, ce qui contribue à préserver l'intégrité de l'îlot et à conserver la région transcriptionnellement active (Brandeis et al., 1994). Des études ont démontré que la méthylation du nucléotide central ne modifie pas l'activité de Sp1. Cependant, la présence de cytosines méthylées en amont ou en aval de l'élément de réponse diminue l'affinité de Sp1. La perte de l'expression de la p21^{Cip1} dans les cellules tumorales pulmonaires est due à l'hyperméthylation de son promoteur et à la perte des liaisons Sp1 / Sp3 (Zhu et al., 2003).

Sp1 a longtemps été considéré comme le seul facteur de transcription capable de lier les boîtes GC / CACCC, mais cette famille comprend aujourd'hui plus de vingt membres. Malgré leurs similarités de séquence et la grande homologie de leur site de reconnaissance, les membres de cette famille présentent un certain nombre de différences au niveau de leur profil d'expression et de leur rôle sur la régulation de la transcription. (Tableau 1,3).

Tableau 1,3. Famille Sp / KLF

GENE	CONSENSUS	ACTIVITE	DISTRIBUTION
Sp1	BOITES GC / CACCC	ACTIVATEUR	UBIQUITAIRE
Sp2	BOITES GC / CACCC	nd	nd
Sp3	BOITES GC / CACCC	ACTIVATEUR / REPRESSEUR	UBIQUITAIRE
Sp4	BOITES GC / CACCC	ACTIVATEUR	CERVEAU
TIEG1	BOITE GC	REPRESSEUR	UBIQUITAIRE
TIEG2	BOITE GC	REPRESSEUR	UBIQUITAIRE
BKLF	CACCC	ACTIVATEUR	UBIQUITAIRE
EKLF	CCACACCCT	ACTIVATEUR	ERYTHROCYTE
GKLF	CACCC, (G/A)/(G/A)GG(C/T)G(C/T)	ACTIVATEUR / REPRESSEUR	ESTOMAC, POUMONS, TESTICULES
LKLF	CACCC	ACTIVATEUR	POUMONS, RATE

CPBP	CCCCACCCA	ACTIVATEUR	PLACENTA, POUMONS, PANCREAS, CŒUR, FOIE, MUSCLE
BTEB1	BOITES GC / CACCC	ACTIVATEUR / REPRESSEUR	UBIQUITAIRE
BTEB2	BOITES GC / CACCC	ACTIVATEUR	TESTICULES, PLACENTA
AP-2rep	GGCGTGGCGG	REPRESSEUR	REIN, FOIE, POUMONS
NSLPI	nd	nd	nd

Le premier facteur de transcription à avoir été identifié après Sp1 est Sp3. Sp3 est un facteur de transcription ubiquitaire qui active ou inhibe la transcription selon le contexte. Bien que certaines études suggèrent que Sp3 active la transcription des promoteurs qui ne contiennent qu'un seul site de liaison à l'ADN et l'inhibe en présence de plusieurs sites (Majello et al., 1997) cette règle ne semble pas toujours observée. Dans la cellule, il existe trois isoformes de Sp3 (deux isoformes d'environ 70 kDa et un isoforme de 115 kDa) qui se différencient par la longueur de leur région N-terminale. Cependant, aucune évidence ne prouve que les deux formes tronquées puissent jouer un rôle dans la répression de la transcription.

Sp3 possède également un domaine inhibiteur, situé entre le deuxième domaine riche en glutamine et le domaine de liaison à l'ADN, qui n'est pas présent chez Sp1. Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que la transformation de Sp3 en répresseur requiert l'acétylation d'un résidu lysine par la p300 (Dennig et al., 1996 ; Braun et al., 2001). Le rôle exact de l'acétylation dans la régulation de l'activité de Sp3 n'est pas encore connu, mais il est possible que cette modification permette le recrutement d'un co-répresseur (SIF-1) bloquant ainsi les interactions avec la machinerie transcriptionnelle de base. Bien que les signaux cellulaires qui conduisent à l'acétylation de Sp3 demeurent inconnus pour l'instant, il semble que la transcription de certains gènes puisse être activée dans les NTERa2-D1 et réprimée dans les HeLa ce qui suggère que toutes les cellules ne répondent pas de la même façon.

Les souris déficientes en Sp3 présentent un retard de croissance sévère et meurent de troubles respiratoires immédiatement après leur naissance. Toutefois, la cause exacte de l'insuffisance pulmonaire n'est pas connue. Les souris Sp3^{-/-} présentent également des problèmes de dentition et de développement osseux. La dent est constituée de deux parties principales : la racine et la couronne. La couronne est majoritairement composée de dentine, une substance semblable au tissu osseux, sécrétée et entretenue par les odontoblastes. Elle est recouverte d'émail, qui joue un rôle de protection. Durant le développement embryonnaire, les améloblastes produisent l'émail et la déposent à la surface de la dent. Chez les souris Sp3^{-/-} l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans l'amélogénèse (amélogénine et améloblastine) entraîne des défauts de la couche d'émail qui semblent expliquer les problèmes dentaires observés. Les gènes spécifiques des odontoblastes (DMP1, tufteline) sont normalement exprimés ce qui suggère que la dentine n'est pas affectée par l'absence d'expression de Sp3. Bien que le rôle exact de Sp3 dans l'expression de l'amélogénine et l'améloblastine n'ait pas encore été déterminé, la présence d'au moins une boîte GC dans le promoteur de ces deux gènes suggèrent un effet direct (Bouwman et al. 2000). Cependant, il n'est pas exclu que la perte de Sp3 puisse aussi modifier la synthèse de facteurs essentiels à l'expression spécifique de l'amélogénine et de l'améloblastine.

Durant le développement embryonnaire, la majorité des os sont formés par ossification endochondrale, un processus qui se déroule à partir d'un modèle de cartilage hyalin. Cependant, la formation des os plats (crâne / clavicule) se fait par une ossification intramembranaire qui permet la différenciation directe des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. Les souris Sp3^{-/-} présentent un retard de l'ossification endochondrale et intramembranaire. Ce délai est dû à la faible expression de l'ostéocalcine, une protéine impliquée dans la différenciation finale des ostéoblastes. Les mécanismes responsables de cet effet sont cependant inconnus puisque le facteur de transcription Cbfa 1, qui est

essentiel à la transcription des gènes qui contrôlent la formation osseuse, est exprimé à un niveau normal chez souris (Göllner et al., 2001).

Les souris $Sp3^{-/-}$ présentent aussi une altération de l'hématopoïèse au niveau des cellules érythroïdes et myéloïdes. Dans le thymus, les cellules T cessent partiellement leur développement aux environs du dix-huitième jour de la gestation alors que dans le foie et la rate, le nombre de cellules B est diminué. L'apparition des érythrocytes dans le sang (jour 15) est également retardée de manière significative en raison d'un défaut au niveau de la différenciation des cellules érythroïdes (Van Loo et al., 2003).

Suite à la découverte de Sp1 et Sp3, d'autres facteurs capables de lier la même séquence consensus, dont Sp2, Sp4, BTEB et BTEB2, se sont joint à la famille (Hagen et al., 1992 ; Imataka et al., 1992 ; Kingsley et Winoto, 1992 ; Sogawa et al., 1993 ; Hagen et al., 1994). Les facteurs Sp possèdent des caractéristiques structurales similaires (domaine de liaison à l'ADN à motif doigt de zinc, domaines activateurs riches en glutamines, régions riches en sérine / thréonine) alors que les facteurs BTEB et BTEB2 partagent uniquement le domaine de liaison de l'ADN. Leur activité activatrice est médiée par un domaine riche en prolines (Latchman et al., 1991). Bien que leur rôle sur la régulation de la transcription soit moins bien caractérisé, BTEB semble pouvoir agir comme activateur ou comme répresseur selon le contexte cellulaire (Imataka et al., 1992) tout comme le fait Sp3.

Sp4 est surtout détecté dans le cerveau et le système nerveux (Hagen et al., 1992). Capable de lier les boîtes GC et CACCC, ce facteur de transcription est cependant incapable d'interagir en synergie avec les autres membres de la famille Sp en raison de l'absence du domaine D dans sa structure (Pascal et Tjian, 1991). Les souris $Sp4^{-/-}$ mâles présentent une absence de comportements sexuels, même si les organes du système reproducteur sont pleinement développés et normaux, ce qui suggère un défaut neurologique cohérent avec

l'expression spécifique de Sp4 dans le tissu neuronal. Sp4 semble également important pour le fonctionnement normal du système cardiaque puisque le 2/3 des souriceaux meurt quelques jours après la naissance des suites d'arythmie cardiaque.

Les KLF sont similaires aux facteurs Sp et BTEB dans leur domaine de liaison à l'ADN, mais se distinguent par leur domaine activateur riche en acides aminés (GKLF et UKLF), riche en prolines (FKLF et LKLF) ou riche en sérines (GKLF et UKLF). Le domaine activateur des facteurs TIEG1 et 2 n'a pas encore été caractérisé. Les variations observées au niveau du domaine de liaison à l'ADN chez ces facteurs pourraient modifier les interactions avec les cofacteurs ou avec la machinerie transcriptionnelle de base.

L'effet d'une déficience de chacun de ces facteurs de transcription sur le développement et la survie des souris commence à être étudié de manière plus approfondie (Philipsen S et Suske G, 1999). Les souris GKLF^{-/-} sont normales à la naissance, mais meurent peu après d'un défaut du système tégumentaire qui empêche la peau d'agir efficacement comme barrière protectrice. Les souris EKLF^{-/-} meurent *in utero* d'une anémie sévère. Chez ces souris, la forme fœtale de la globine (γ) est exprimée, mais pas la forme adulte (β) ce qui cause un défaut de l'érythropoïèse définitive (Nuez et al., 1995 ; Perkins et al., 1995). Le phénotype des souris EKLF^{-/-} correspond à ce qui est observé dans certaines formes de β -thalassémie où une mutation de l'élément de réponse EKLF a été identifié. Par ailleurs, les souris LKLF^{-/-} présentent des anomalies au niveau de la morphogénie des vaisseaux sanguins ce qui induit la mort par hémorragie au stade embryonnaire. Ce facteur aurait aussi un rôle dans le maintien des cellules T matures. Les cellules T matures, qui expriment fortement le LKLF, sont inactives jusqu'à ce qu'elles rencontrent leur antigène. Cependant, chez les souris LKLF^{-/-}, ces cellules sont constitutivement actives. Les souris BKLF^{-/-} présentent également des troubles du système immunitaire, principalement des cellules myéloïdes.

1.4.3.2 Co-facteurs impliqués dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription de la famille Sp

Les membres de la famille Sp peuvent faire de nombreuses interactions avec d'autres facteurs de transcription ou avec des co-facteurs par l'intermédiaire de la région C-terminale. Un de ces co-facteurs, CRSP₃₃, est nécessaire à l'activité de Sp1. Les membres de la famille CRSP sont des sous-unités protéiques qui peuvent s'assembler pour former le complexe CRSP. Ce complexe, dont la masse moléculaire est d'environ 700 KDa, est formé de neuf sous-unités dont la fonction est parfois encore mal connue. Une étude réalisée récemment a cependant démontré que le complexe CRSP peut faire des interactions avec la polymérase à ARN II (Naär et al., 2002). Bien que les sous-unités du complexe CRSP impliquées dans cette interaction n'aient pas encore été identifiées, il est possible que CRSP₃₃ soit impliqué. CRSP₃₃ est l'homologue de MED7, une protéine qui est impliquée dans l'activation de la transcription chez la levure. La sous-unité CRSP₁₅₀ a également un homologue chez la levure, la protéine Rgrl, qui joue aussi un rôle important dans l'activation de la transcription chez la levure.

Outre leur homologie avec des protéines impliquées dans l'activation de la transcription, certaines sous-unités du complexe CRSP, dont CRSP₇₀, sont similaires à un facteur d'élongation de la transcription, la protéine SII. Enfin, les sous-unités CRSP₂₀₀, CRSP₁₃₀, CRSP₈₅, CRSP₁₀₀, CRSP₃₄ et CRSP₇₇ sont encore mal caractérisées. Toutefois, on sait que CRSP₃₄ et CRSP₇₇ sont présents dans d'autres complexes. Un de ces complexes est impliqué dans l'activation de la transcription par des récepteurs nucléaires tels que le PPAR γ , le récepteur aux rétinoïdes X et le récepteur à la vitamine D. Les sous-unités CRSP₃₃ et CRSP₁₀₀ sont également trouvées dans un autre complexe protéique, le SMCC. Le SMCC est un complexe de 16 sous-unités dont la plupart n'ont pas encore été caractérisées. Le complexe NAT, qui est formé de 18 sous-unités contient lui aussi deux sous-unités CRSP, la CRSP₃₃ et la CRSP₇₀. Cependant, contrairement aux autres complexes, le complexe NAT réprime la transcription.

Finalement, il a été démontré que le complexe ARC/DRIP est formé du complexe CRSP et du complexe ARC-L. Cependant, alors que les neuf sous-unités du complexe CRSP sont actives, les huit sous-unités du complexe ARC-L semblent inactives.

Les données recueillies lors des études sur les différents complexes qui possèdent des sous-unités CRSP suggèrent que c'est la combinaison des sous-unités réunies dans un complexe qui régule l'activité du co-facteur. Cette hypothèse est d'ailleurs supportée par une étude qui a montré que la présence des sous-unités CRSP₃₃, CRSP₁₃₀ et CRSP₁₅₀ est suffisante pour atteindre le maximum d'activation in vitro. Il reste cependant à déterminer si chaque sous-unité joue un rôle unique ou si c'est la composition particulière de chaque complexe qui permet d'obtenir une conformation spécifique capable de réguler la transcription d'une manière différente (Ryu et al., 1999 ; Taatjes et al., 2002 ; Meisterernst et al., 2002).

Le cofacteur p74 peut également interagir avec le facteur de transcription Sp1. Contrairement au complexe CRSP, la protéine p74 inhibe la transcription induite par Sp1 en se liant à son domaine activateur et en prévenant son interaction avec le complexe d'initiation de la transcription. Tout comme CRSP, la protéine p74 est exprimée de manière ubiquitaire, ce qui suggère que selon les conditions cellulaires, le cofacteur qui interagit avec Sp1 pourrait varier. Une étude a d'ailleurs démontré que la liaison entre p74 et Sp1 est favorisée par la phosphorylation du domaine N-terminal par une protéine kinase dépendante de l'ADN (Murata et al., 1994).

La possibilité que des cofacteurs (activateur ou répresseur) puissent également interagir avec les autres membres Sp / KLF n'a pas encore été étudiée, mais la liste est probablement appelée à s'agrandir.

L'étude de la régulation de la transcription dans les promoteurs riches en nucléotides G et C est non seulement compliquée par la diversité des facteurs Sp / KLF, mais également par la multitude de facteurs qui peuvent lier ces éléments de réponse. De nombreux facteurs, dont Egr-1, AP-2, Maz, ETF (répresseur), GCF-1 (répresseur), WT-1 (répresseur), ZBP (répresseur), lient tous des séquences similaires aux boîtes GC / CACCC ce qui suggère qu'*in vivo* plusieurs facteurs pourraient compétitionner pour un même site. De plus, la localisation de ces sites les uns par rapport aux autres influence grandement l'activité du promoteur (Cao et al., 1993 ; Kramer et al., 1994 ; Khachigian et al., 1994 ; Skarka et al., 1995 et Lin JX et LeonarWJ, 1997). Le facteur Egr-1 par exemple peut se lier à un consensus riche en nucléotides G et C qui peut être juxtaposé au site Sp1 ou s'y superposer. Lorsque les deux sites sont juxtaposés, comme dans le promoteur de la chromogranine A, les deux facteurs coopèrent pour activer la transcription, mais lorsqu'ils se superposent, la liaison de Egr-1 bloque celle de Sp1 (Huang et al., 1997). De façon similaire, le promoteur du gène de la kératinine K3 contient un site AP-2 (répresseur) et un site Sp1 qui se chevauchent. Dans la cellule, le niveau d'expression de ces deux facteurs, leur capacité à lier l'ADN ou leur activité, va influencer le niveau d'ARNm de la kératinine K3. Certains cas de synergie entre deux sites superposés ont aussi été rapportés comme c'est le cas pour Sp1 et Pit-1 dans le promoteur de l'hormone de croissance chez le rat (Schaufele et al., 1990).

Les facteurs de transcription qui interagissent avec Sp1 peuvent également se lier à une bonne distance du site Sp1. Par exemple, dans le promoteur du gène de la dihydrofolate réductase, le facteur E2F interagit avec Sp1, même si les deux sites ne sont pas à proximité l'un de l'autre. Smad 4 coopère également avec Sp1 pour stimuler la transcription des gènes induits par le TGF- β . Cependant, il semble que la distance à laquelle peuvent se trouver les deux sites de liaison ait une limite puisque des études ont démontré que l'efficacité de la synergie diminue avec la distance.

1.4.3.3 Maladies génétiques et facteurs de transcription Sp

Le rôle que pourrait jouer les membres de la famille Sp dans le développement de pathologies est encore mal connu. Cependant, l'implication de ces facteurs de transcription dans la régulation d'un très grand nombre de gènes suggère qu'ils pourraient être responsables de plusieurs anomalies d'origine génétique.

La première pathologie impliquant Spl à être identifiée est la maladie de Huntingdon, une maladie génétique neurodégénératrice qui se caractérise par un déficit moteur et cognitif progressif qui entraîne la mort à plus ou moins long terme. Des études récentes ont montré que la maladie de Huntingdon est due à une extension d'un triplet CAG dans le gène de la huntingtine. L'extension de ce triplet entraîne un allongement de la région riche en glutamine dans la protéine mutante et il semble que plus la répétition est augmentée, plus la maladie se développera rapidement et plus sévères seront les symptômes. Il semble de plus en plus probable qu'une compétition entre Spl et la protéine huntingtine mutante soit à l'origine de la maladie de Huntingdon. Spl contient deux domaines riches en glutamine impliqués dans l'activation de la transcription par l'intermédiaire de liaisons avec la sous-unité TAF_{III30} de la machinerie transcriptionnelle de base. L'augmentation du motif glutamine de la huntingtine mutante la rend capable de compétitionner la TAF_{III30} pour la liaison à Spl. La protéine Spl liée à la huntingtine n'est dès lors plus disponible pour activer la transcription. Plus l'augmentation du motif glutamine est importante, plus la huntingtine aura d'affinité pour Spl et plus la transcription des gènes qui sont sous le contrôle de Spl en sera affectée, ce qui explique la sévérité des symptômes chez ces patients. Puisque Spl est impliqué dans la régulation de la transcription d'un large éventail de gènes, il semble probable que l'expression de nombreux gènes sont affectés par sa séquestration par la huntingtine. Cependant, le récepteur D2 de la dopamine serait un des principaux gènes sous le contrôle de Spl dont la modification du niveau d'expression serait responsable des symptômes de la maladie. Il est toutefois probable que l'identification d'autres gènes suivra (Freiman RN et Tjian R, 2002).

La kératose disséminée circonscrite de Jadassohn-Lewandowsky est un autre exemple de maladie génétique qui peut impliquer le facteur de transcription Sp1. Cette dystrophie est caractérisée par des lésions cutanées sèches, un épaissement de la peau de la paume des mains et de la plante des pieds, de même que des ongles (doigts et orteils), des lésions bénignes buccales et une apparition de kératine sur la cornée. Comme c'est le cas pour la maladie de Huntington, la kératose disséminée circonscrite de Jadassohn-Lewandowsky n'implique pas directement une mutation de Sp1. C'est plutôt le gène DKC1, codant pour la dyskérine, qui est impliqué. Le séquençage de ce gène et de sa région promotrice a permis de démontrer que bien que la majorité des mutations présentes chez les patients soient des mutations non-sens, qui entraînent la synthèse de protéines anormales, une mutation dans un élément de réponse Sp1 a également été observée chez un patient (Knight et al., 2000 ; Salowsky et al., 2002).

Le facteur de transcription Sp1 pourrait également jouer un rôle dans certaines leucémies résistantes à la doxorubicine. Chez les patients qui souffrent de cette forme de leucémie, les cellules développent une résistance multiple aux médicaments (mdr). Le phénotype mdr est associé à l'activation de la transcription de nombreux gènes dont le rôle reste à être défini, mais le gène *mdr1*, une pompe membranaire qui expulse les médicaments hors de la cellule, a été mieux caractérisé (Zhu Q et Center MS, 1994). Les HL-60, une lignée cellulaire établie à partir des cellules myéloblastiques d'un patient souffrant d'une leucémie promyélocytique aigüe, représentent un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des résistances multiples. Des études ont démontré une élévation du niveau d'expression de Sp1 dans ces cellules. De plus, il semble que l'affinité de ce facteur pour son élément de réponse situé dans le promoteur du gène *mdr1* soit augmentée, ce qui pourrait expliquer la hausse de l'expression de ce gène (Borellini et al., 1990). Bien que les voies de signalisation impliquées dans cet effet n'ont pas encore été caractérisées, le rôle activateur de la doxorubicine sur

l'activité de Sp1 a déjà été démontré. Puisque le promoteur de Sp1 contient lui-même cinq boîtes GC (Jackson et al., 1990), la doxorubicine pourrait déclencher un rétro-contrôle positif responsable de l'apparition du phénotype de résistances multiples.

1.4.4 Aberrations transcriptionnelles

De nombreux défauts génétiques peuvent entraîner une transcription génique aberrante. Un de ces défauts est le réarrangement chromosomique. Certains promoteurs sont actifs seulement dans certains types de cellules. Un gène dont le promoteur est inactif dans les cellules surrénaliennes par exemple ne serait donc pas exprimé dans ce tissu. Toutefois, si ce gène devait être déplacé en aval d'un promoteur qui lui est actif dans les cellules surrénaliennes, il serait alors exprimé de manière aberrante dans ce tissu. Au niveau des pathologies endocriniennes, le réarrangement est entre autres observé dans certains adénomes de la parathyroïde (Rosenberg et al., 1991), où le promoteur de la PTH est recombiné en amont du gène de la cycline D. Un autre exemple de réarrangement chromosomique est observé dans certains cas d'hyperaldostérisme où le gène de l'aldostérone synthase fusionne avec le promoteur de la 11 β -hydroxylase, ce qui entraîne la production ectopique d'aldostérone par la zone fasciculée (Lifton et al., 1992).

Les polymorphismes sont également responsables de l'expression anormale de certains gènes. Les polymorphismes représentent l'existence, dans une même population, de deux ou plusieurs formes d'un locus et dont la forme la plus rare ne peut pas être expliquée par une mutation récurrente. Généralement, seules les différences observées à une fréquence supérieure à 1 % sont considérées comme des polymorphismes. Dans le génome, les séquences répétées sont particulièrement sensibles aux polymorphismes.

Les séquences répétées en tandem (VNTR) sont fréquentes dans le génome. Elles se divisent en trois classes selon le nombre de répétitions qui les forme :

les satellites, les minisatellites et les microsatellite. Les satellites sont formés d'une séquence de deux à cent nucléotides qui peut être répétée plus de mille fois. Ils sont localisés dans les régions non transcrites, principalement près des centromères. Tout comme les satellites, les minisatellites sont variables en nombre et en taille. Certains minisatellites peuvent contenir un motif central à forte homologie avec la séquence chi de *E.coli* (GGGCAGGANG). Chez *E.coli*, la séquence chi constitue un signal de recombinaison de l'ADN, ce qui pourrait expliquer la forte prévalence des polymorphismes dans ces régions. Les minisatellites présents dans l'ADN télomérique (TTAGGG) sont également parmi les plus connus. Leur rôle est de protéger l'extrémité des chromosomes de la dégradation. Le dernier groupe de VNTR est le microsatellite. Il se présente sous forme d'une courte séquence d'un à quatre nucléotides répétée tout au plus vingt-cinq fois. Les microsatellites sont répartis sur l'ensemble du génome et leur fonction est inconnue quoique certains d'entre eux aient été associés à une pathologie. C'est le cas, entre autres, de la séquence (cgg)_n localisé sur le X. Dans la population ce microsatellite est habituellement répété de six à cinquante-quatre fois, mais il peut être reproduit à plus de mille exemplaires dans la maladie du X-fragile, ce qui affecte la méthylation de l'ADN et a pour conséquence d'inactiver l'expression génique dans une région normalement active du chromosome. D'autres microsatellites sans impact phénotypique connu sont largement distribués dans le génome. C'est le cas notamment de la répétition (A)_n, qui est observée tous les 5 à 10 kb, de la répétition (CA)_n, répétée tous les 25 à 100 kb, de la répétition (TC)_n, retrouvée à tous les 50 kb et de la répétition (TTA)_n, dont la fréquence est d'environ une fois tous les 300 à 500 kb.

Qu'ils surviennent dans les VNTR, ou ailleurs dans le génome, les polymorphismes se présentent sous forme d'insertion, de délétion ou de mutation ponctuelle. Les mutations ponctuelles, aussi appelées substitution, sont de quelques nucléotides au maximum. Elles représentent une source majeure de polymorphismes (une mutation tous les deux cents à mille nucléotides) chez les

individus non consanguins et se divisent en deux catégories : les transitions et les transversions. Les transitions correspondent au changement d'une purine pour une autre purine (A, G) ou d'une pyrimidine pour une autre pyrimidine (C, T) alors que les transversions modifient une purine pour une pyrimidine ou l'inverse. Les mutations ponctuelles qui surviennent dans les régions non codantes peuvent n'avoir aucune conséquence ou au contraire modifier l'activité d'un promoteur. Lorsqu'elles sont localisées dans les régions codantes, elles peuvent également être silencieuses (en raison de la dégénérescence du code génétique) ou changer l'acide aminé codé. Par exemple, la mutation du A pour un G en position 3 sur le codon GAA (GAG) n'entraîne aucune variation de la séquence protéique (les deux codons codent pour le glutamate) alors qu'une mutation introduisant un C à la même position (GAC) transformerait le glutamate en aspartate.

L'effet des insertions / délétions est également variable selon la région d'ADN où ils ont lieu. L'insertion représente l'ajout d'un ou de quelques nucléotides dans une région d'ADN. L'effet d'une insertion localisée dans une région non codante est le même que celui décrit pour les mutations ponctuelles. Les microsattellites sont particulièrement sensibles aux insertions durant la mitose, au moment de la réplication. Lorsque l'insertion survient à l'intérieur d'un exon, la conséquence qui en résulte dépend du nombre de nucléotides qui sont insérés. Lorsque ce nombre est un multiple de trois, un ou des acides aminés seront insérés dans la séquence protéique, mais le cadre de lecture sera conservé, sauf si le codon inséré représente un codon d'arrêt. Dans ce cas, l'insertion entraînera plutôt la synthèse d'une protéine tronquée. Si le nombre de nucléotides insérés est autre, le cadre de lecture sera changé donnant naissance à une protéine tronquée (insertion d'un codon d'arrêt) ou à une protéine complètement aberrante (modification du cadre de lecture). Il en est de même pour les délétions. Les insertions et les délétions jouent un rôle dans certaines maladies génétiques connues. Par exemple, chez les patients qui souffrent de la mucoviscidose, l'anomalie la plus fréquemment retrouvée est la délétion de

l'acide aminé en position 508 du gène CFTR, une protéine membranaire qui entre dans la formation d'un canal ionique sélectif aux anions, et plus particulièrement au Cl^- .

De nombreux mécanismes contribuent à la génération de polymorphismes. Les erreurs du système de réplication / réparation de la cellule sont responsables d'un certain nombre de mutations aléatoires dans le génome. Ces erreurs surviennent tous les 10^9 bp. Puisque ces mutations surviennent dans les lignées somatiques, elles ne peuvent se transmettre à la génération suivante et ne contribuent pas à la génération de polymorphisme. Cependant, les ovules et les spermatozoïdes subissent des mutations à un rythme similaire et les mutations qu'ils contiennent sont alors retrouvées chez la descendance. Le glissement intra-chromatidien crée aussi des erreurs lors de la réplication dans les régions qui comportent des répétitions multiples (exemple général : $(\text{CA})_{12}$). La polymérase à ADN, tout comme la TAQ lors de la réaction de PCR, a de la difficulté à reproduire le nombre exact de répétitions en raison d'une réaction de glissement. La conséquence est l'ajout ou le retrait d'un ou de plusieurs répétitions ($(\text{CA})_{12} \rightarrow (\text{CA})_{13}$ ou $(\text{CA})_{12} \rightarrow (\text{CA})_{11}$).

Les mutations chimiques sont responsables d'un grand nombre de mutations. Par exemple, une réaction d'hydrolyse entraîne constamment une dépurination spontanée (la purine est remplacée par un groupe hydroxyle) ou des transitions tautomériques ($-\text{NH}_2$ pour $-\text{N}=\text{H}$ / $\text{C}=\text{O}$ pour $\text{C}-\text{O}-\text{H}$). Les réactions de désamination transforment également les nucléotides. Par exemple, les adénines sont changées en hypoxanthine, les guanines en xanthine et les cytosines en uracile. Les désaminations sont habituellement reconnues par le système de réparation de la cellule. Cependant, la désamination d'une cytosine méthylée crée une thymine, une molécule qui est normalement présente dans l'ADN et qui n'active pas le système de réparation. De même, si la réparation d'une erreur est imparfaite, la mutation devient permanente. Dans le cas des mutations somatiques, la cellule peut se diluer dans la population cellulaire (si la mutation

est sans effet), mourir (si la mutation est délétère) ou proliférer de manière anarchique (si la mutation procure un avantage sélectif comme c'est le cas pour les tumeurs). Lorsque la mutation survient dans une lignée germinale, elle est transmise aux autres générations et peut contribuer à générer des polymorphismes. L'exposition aux agents mutagènes (les radicaux libres endogènes ou les rayons UV exogènes) provoque également des anomalies qui doivent être réparées par la cellule.

Les recombinaisons inégales contribuent elles aussi à l'apparition des polymorphismes. Elles surviennent principalement lors d'une recombinaison entre deux séquences très semblables, mais non homologues. L'appariement de ce type de séquences entraîne des erreurs d'alignement (mésappariement) ce qui provoque l'élimination d'une région sur un des chromosomes et sa duplication sur l'autre. Ces erreurs pourraient d'ailleurs être à l'origine des familles de gènes à partir d'un gène ancestral au cours de l'évolution. Les régions répétées en tandem sont particulièrement touchées par ce phénomène. Le nombre de répétition est alors augmenté sur un des chromosomes et diminué sur l'autre.

L'insertion de séquences mobiles appelées transposons (LINE / SINE) ou de séquences virales, qui sont capables de migrer vers différentes régions du génome, peuvent également jouer un rôle dans la formation des polymorphismes, de même que l'excision des boucles chromatidiennes lors de la réplication.

Les anomalies génétiques peuvent également être dues à une mutation isolée du promoteur sans aucun lien avec les polymorphismes. Ces mutations impliquent un seul ou plusieurs nucléotides et modifient un site de liaison à l'ADN. Les mutations du promoteur ont donc pour conséquence d'empêcher la liaison d'un facteur de transcription qui se lie normalement à ce promoteur, ou encore, de permettre la liaison d'un facteur qui ne devrait pas s'y lier ce qui entraîne l'expression aberrante du gène.

Lorsqu'elles n'affectent pas directement le promoteur, les mutations peuvent survenir dans les facteurs qui régulent la transcription ou leur co-facteur. Comme c'était le cas pour les mutations du promoteur, les mutations présentes dans les facteurs de transcription peuvent les empêcher de lier l'ADN. Toutefois, il est aussi possible que les mutations affectent les interactions protéine-protéine ou encore l'activité du facteur selon la région dans laquelle elles surviennent (Lewin B, 1991).

Jusqu'à présent, aucun réarrangement chromosomique impliquant le GIPR n'a été observé dans les cellules corticosurréaliennes des patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Chez les patients où un seul récepteur hormonal aberrant / ectopique a été observé, l'hypothèse d'une mutation du promoteur est tout aussi probable que celle de la mutation d'un facteur de transcription ou de ces co-facteurs. Toutefois, chez les patients où plusieurs récepteurs sont exprimés simultanément, il serait étonnant que plusieurs mutations soient apparues dans des promoteurs différents. Chez ces patients, il semble donc plus probable que l'anomalie implique un facteur de transcription commun à la régulation de l'expression de plusieurs récepteurs. Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour but d'étudier la région promotrice du gène qui code pour le GIPR, afin d'y déceler des mutations potentielles, et d'identifier les facteurs de transcription qui régulent l'expression du GIPR en physiologie normale, afin de déterminer leur implication possible dans l'apparition du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

CHAPITRE 2

MÉTHODES



2. Méthodes

2.1 Expression du GIPR dans les tissus humains

2.1.1 Transfert en points

2.1.1.1 Préparation de la sonde

La sonde spécifique pour le GIPR est préparée à partir du cDNA du GIPR, clivée par les enzymes Pst-I (387 pb) et SmaI (1195 pb) alors que la sonde spécifique pour l'ubiquitine est fournie par Clontech. Les deux sondes sont dénaturées 5 minutes à 95°C puis le brin complémentaire est synthétisé à l'aide de l'enzyme Klenow (Invitrogen), en présence de ^{32}P dCTP (1 X tampon Klenow ; 50 ng sonde GIPR ou ubiquitine ; 50 μM dATP, dTTP, dGTP ; 0,15 μg amorces aléatoires ; 10 μCi ^{32}P dCTP ; 6 U Klenow) durant 1 h à 25°C.

2.1.1.2 Hybridation

La membrane contenant les ARNm (Clontech) est d'abord pré-hybridée pendant 30 min dans 10 ml de Quick Hyb (Invitrogen) à 68°C puis hybridée en présence de la sonde GIPR (10×10^6 CPM en présence de 1 μg d'ADN de sperme de saumon) pour 2 h à 68°C. La membrane est ensuite lavée pendant 10 min à la température de la pièce dans une solution 2 X SSC (300 mM NaCl, 30 mM citrate de sodium pH 7,0) / 0,1 % SDS, puis pendant 10 min à 55°C dans une solution 0,5 X SSC / 0,1 % SDS. La membrane est ensuite dé-hybridée à ébullition dans une solution 0,01 X SSC / 0,01 % SDS, puis hybridée une seconde fois à l'aide de la sonde ubiquitine (10×10^6 CPM en présence de 1 μg d'ADN de sperme de saumon) pendant 1 h à 68°C dans 10 ml de Quick Hyb. La membrane est ensuite lavée dans les mêmes conditions que pour le GIPR. La détection se fait au PhosphorImager après 24 h d'exposition pour la sonde spécifique GIPR et après 2 h d'exposition pour la sonde spécifique ubiquitine.

2.1.2 Transcription inverse

L'ARN, extrait de tissus humains (Ambion), est inversement transcrit à l'aide de la transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen) dans un volume final de 20 μl (2 μg ARN ; 1 X tampon M-MLV ; 10 mM DTT ; 0,5 mM dNTPs ; 0,02 μg

amorces aléatoires ; 0,5 U RNase out ; 0,5 U M-MLV). Le mélange est incubé pendant 1 h à 37°C.

2.1.3 PCR

Les amorces GIPR sens ($5'$ tgtagcctgaacaaactc $3'$) et GIPR anti-sens ($5'$ gggacaggcctgatgccccct $3'$) sont utilisées pour amplifier la région du GIPR humain, comprise entre 50 pb et 595 pb, à l'aide de la polymérase à ADN TAQ dans un volume final de 25 μ l (1 X tampon TAQ ; 0,2 μ M amorces GIPR sens et anti-sens ; 0,2 μ M amorces 18S ; 0,2 mM dNTPs ; 2 mM $MgCl_2$; 1,25 % formamide ; 2 μ l cDNA ; 0,05 U TAQ). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 10 s à 55°C, 1 min à 72°C) et d'une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1,5 % et la révélation est faite au PhosphorImager par coloration au bromure d'éthidium.

2.2 Expression du GIPR dans les échantillons de tissu surrénalien

2.2.1 Échantillons

Les échantillons de tissu surrénalien utilisés dans cette étude proviennent de patients ayant subi une surrénalectomie pour un syndrome de Cushing dépendant du GIP (1 adénome unilatéral et 6 hyperplasies macronodulaires bilatérales), pour un adénome unilatéral non dépendant du GIP (7), pour une maladie de Cushing (7) ou pour un carcinome surrénalien (2). Les échantillons de tissu surrénalien normaux proviennent de patients ayant subi une néphrectomie radicale complète pour un hypernéphrome (7).

Les tissus obtenus suite à la chirurgie sont immédiatement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Un consentement éclairé a été obtenu de chaque patient et cette étude a été approuvée par un comité d'éthique institutionnel.

2.2.2 Transcription inverse et PCR

L'ARN, extrait de tissus congelés à l'aide du Trizol (Invitrogen), ou obtenu commercialement (Ambion), est inversement transcrit à l'aide de la transcriptase inverse M-MLV tel que décrit dans la section 2.1.2. La réaction de PCR est effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 2.1.3.

2.3 Expression du GIPR dans les lignées cellulaires humaines

2.3.1 Culture cellulaire

Les cellules épithéliales HGT-1, établies à partir d'un carcinome gastrique, ont été généreusement offertes par le professeur Labois (Labois et al., 1982). Les cellules épithéliales HeLa, établies à partir d'un adénocarcinome du col de l'utérus, proviennent du laboratoire de la D^{re} Johanne Tremblay (Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada), alors que les cellules épithéliales HepG2, établies à partir d'un carcinome hépatique, proviennent du laboratoire du D^r Pangala Bhat (Centre hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Canada). Les cellules HT-29, établies à partir d'un adénocarcinome colorectal et les cellules épithéliales embryonnaires de rein humain HEK 293 proviennent d'ATCC.

Toutes les cellules sont mises en culture dans des plaques 100 mm en présence de DMEM⁺ (Invitrogen) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) (Invitrogen) et 100 µg/ml de chacun des antibiotiques pénicilline et streptomycine (Sigma).

2.3.2 Transcription inverse et PCR

L'ARN extrait d'une plaque (100 mm) de cellules à confluence à l'aide du Trizol est inversement transcrit à l'aide de la transcriptase inverse M-MLV tel que décrit dans la section 2.1.2. La réaction de PCR est effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 2.1.3.

2.4 Préparation des fragments du promoteur du hGIPR

2.4.1 Isolement de l'ADN génomique

Les cellules embryonnaires de rein humain HEK 293 sont cultivées à confluence dans une plaque 100 mm en présence de DMEM⁺ supplémenté avec 10 % de FBS et 100 µg/ml de chacun des antibiotiques pénicilline et streptomycine. Une fois à confluence, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1 X pH 7,3 (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 4,3 mM Na₂HPO₄ ; 1,4 mM KH₂PO₄) puis incubées 30 minutes dans 500 µl de NIB (10 mM NaCl ; 10 mM Tris / HCl 1 M pH 7,5 ; 1,5 mM MgCl₂) et centrifugées 5 minutes à 13 000 rpm. Le culot est ensuite suspendu dans 500 µl de TPA (10 mM Tris / HCl 1 M pH 8,0 ; 2 mM EDTA pH 8,0 ; 0,4 mM NaCl ; 0,5 % SDS ; 0,4 mg protéinase K) et incubé 16 h à 37°C. L'ADN est ensuite purifié par trois extractions successives à l'aide de phénol et de chloroforme et précipité à l'éthanol. La concentration et la qualité de l'ADN sont ensuite déterminées par spectrophotométrie.

2.4.2 Amplification par PCR

2.4.2.1 Amplification des fragments de type sauvage

Des fragments de différentes longueurs sont amplifiés suite à deux réactions de PCR consécutives. La première réaction de PCR est réalisée en présence d'amorces spécifiques pour le promoteur du hGIP-R, auxquelles sont ajoutés douze nucléotides spécifiques pour les sites de recombinaison AttB1 (amorces sens) et AttB2 (amorce anti-sens) (Tableau 2,1). La réaction est réalisée dans un volume de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 mM dNTPs ; 0,25 µM amorces sens et anti-sens ; 1 mM MgCl₂ ; 0,05 U TAQ ; 100 ng ADN génomique). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 10 cycles (15 s à 95°C, 20 s à 50°C et 20 s à 72°C) pour l'amorce A-1837, (15 s à 95°C, 20 s à 53°C, 20 s à 72°C) pour les amorces A-336 et A-729, (15 s à 95°C, 20 s à 55°C, 20 s à 72°C) pour l'amorce A-948, (15 s à 95°C, 20 s à 56°C, 20 s à 72°C) pour l'amorce A-1350 et (15 s à 95°C, 20 s à 58°C, 20 s à 72°C) pour les amorces A-422, A-473 et A-2065), et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Un deuxième tour de PCR est ensuite réalisé

en présence des amorces spécifiques pour les sites de recombinaison AttB1 et AttB2 (Tableau 2,1). Cette seconde amplification de 20 cycles est réalisée dans un volume de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 mM dNTPs ; 0,2 µM amorce AttB1 sens ; 0,2 µM amorce AttB2 anti-sens ; 1 mM MgCl₂ ; 0,05 U TAQ ; 1/5 V du produit de la réaction 1). Les conditions de PCR consistent en une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 5 cycles (15 s à 95°C, 15 s à 45°C et 20 s à 72°C), d'une amplification de 15 cycles (15 s à 95°C, 15 s à 55°C et 20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C.

Tableau 2.1. Amorces utilisées pour l'amplification des fragments du promoteur du GIP-R.

AMORCE	SÉQUENCE
attB1 (s)	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct
attB2 (as)	ggggaccactttgtacaagaagctgggt
A-66 (s)	<i>aaaaagcaggctccccctccatcac</i>
A-75 (s)	<i>aaaaagcaggcttggccccgcccct</i>
A-97 (s)	<i>aaaaagcaggctctccccgcttcctcctgt</i>
A-160 (s)	<i>aaaaagcaggcttaactgccctccctcatgac</i>
A-336 (s)	<i>aaaaagcaggctgtgactgtgccttccatggctc</i>
A-360 (s)	<i>aaaaagcaggctgtgagtaacagcttgagg</i>
A-390 (s)	<i>aaaaagcaggctctgtatgggtgtgactg</i>
A-422 (s)	<i>aaaaagcaggctgagactgtggctgtctgg</i>
A-473 (s)	<i>aaaaagcaggctcctgggtacatgactgtg</i>
A-500 (s)	<i>aaaaagcaggctactgtgtgtgtgcagga</i>
A-550 (s)	<i>aaaaagcaggctatgtgtgtgtgattg</i>
A-729 (s)	<i>aaaaagcaggctgcgagtaaccacacaactgc</i>
A-949 (s)	<i>aaaaagcaggctccagcctgggcaacatggg</i>
A-1340 (s)	<i>aaaaagcaggctcccagctactcggaggctga</i>
A-2068 (s)	<i>aaaaagcaggctgctgagcactgggtacacatgga</i>
A+73 (as)	<i>agaaagctgggtggattggggagccctcacctgt</i>

Gras / italique : nucléotides spécifiques pour les site de recombinaison attB1 (amorces sens) et attB2 (amorces anti-sens).

2.4.2.2 Amplification des fragments de type muté

Les fragments mutés sont amplifiés par PCR à partir de la construction sauvage GIPR_{prom}-336/+73. Les mutants GC-82/-77 et GC-70/-65 sont amplifiés par un tour de PCR à l'aide des amorces mutantes A-100/-54 sens et A-100/-43 sens respectivement (Tableau 2,2) et de l'amorce sauvage A+73 anti-sens (Tableau 2,1), dans un volume de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 mM dNTPs ; 0,2 µM amorces sens et anti-sens ; 1 mM MgCl₂ ; 0,05 u TAQ ; 50 ng ADN GIPR-100/+73). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 20 s à 58°C et

20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. En raison de leur taille, les mutants GC-53/-48, GC-237/-232, GT-229/-223 et GT-156/-150 sont amplifiés à l'aide de deux cycles de PCR. Le premier cycle consiste à produire une amorce contenant le fragment muté. Les mutants GC-237/-232, GT-229/-223 et GT-156/-150 sont amplifiés à l'aide des amorces mutantes A-259/-228 anti-sens, A-241/-212 anti-sens et A-163/-133 anti-sens respectivement (Tableau 2,2) et de l'amorce sauvage A-336 sens (Tableau 2,1), dans un volume de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 mM dNTPs ; 0,2 µM amorces sens et anti-sens ; 1 mM MgCl₂ ; 0,05 u TAQ ; 50 ng ADN GIPR-336/+73). Le mutant GC-53/-48 est amplifié à l'aide de l'amorce mutante A-65/-30 anti-sens (Tableau 2,2) et de l'amorce sauvage A-100 sens (Tableau 2,1) dans les mêmes conditions expérimentales. La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 25 cycles (15 s à 95°C, 20 s à 58°C et 20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Le deuxième cycle de PCR consiste à utiliser l'amorce produite durant le premier cycle afin d'amplifier la région totale dans un volume de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 mM dNTPs ; 1/5 V du produit de PCR 1 ; 0,2 µM amorce anti-sens A+73 ; 1 mM MgCl₂ ; 0,05 u TAQ ; 50 ng ADN GIPR-336/+73). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation initiale de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 20 s à 60°C et 20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C.

Tableau 2.2. Amorces utilisées pour l'amplification des fragments mutés du promoteur du GIPR.

AMORCE	SÉQUENCE
A-259 / -228 (as)	accacaggtaccggaaccaccgccaactcat
A-241 / -212 (as)	tctctcatgctgtccaaccacaggtacc
A-163 / -133 (as)	tcatcaaggctcatgaggaaaggcagttactg
A-100 / -54 (s)	<i>aaaaagcaggctctccccgcttcggttcctgtcaagccttgccccgccccctccc</i>
A-100 / -43 (s)	<i>aaaaagcaggctctccccgcttcggttcctgtcccgcttgccaagaaccctccatcacccc</i> gggct
A-65 / -30 (as)	<i>gacaggcgctggcagccattgggtgatggaggggg</i>

Gras / italique : nucléotides spécifiques pour les site de recombinaison attB1 (amorces sens) et attB2 (amorces anti-sens).

2.4.2.3 Amplification des régions nCaRE

Les amorces nCaRE A-5848 sens (5' gaattcccctcaccctcttat^{3'}), nCaRE A-5363 sens (5' gaattctatctgcctcccactct^{3'}), nCaRE A-5218 anti-sens (5' gatatctcctttaactccgacgtcaggaaattgaggctgcag^{3'}) et nCaRE A-5541 anti-sens (5' gatatccccagctgttggggaga^{3'}) sont utilisées pour amplifier trois régions du promoteur du hGIP-R comprenant l'élément nCaRE 1 (-5848 pb à -5541 pb), l'élément nCaRE 2 (-5363 pb à -5218 pb) ou les éléments nCaRE 1 et 2 (-5848 pb à -5218 pb) à l'aide de la polymérase à ADN TAQ dans un volume final de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 µM amorces sens et anti-sens ; 0,2 mM dNTPs ; 2 mM MgCl₂ ; 100 µg ADN génomique ; 0,05 u TAQ). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 10 s à 55°C, 30 s à 72°C) pour les amorces A-5848 sens et A-5218 anti-sens, (15 s à 95°C, 10 s à 55°C, 20 s à 72°C) pour les amorces A-5848 sens et -5541 anti-sens, de même que pour les amorces A-5363 sens et -5218 anti-sens et d'une élongation finale de 7 min à 72°C.

2.4.3 Purification des produits de PCR

Les produits de PCR sont chargés sur un gel d'agarose 1 % puis la migration se déroule à 90 mV. La détection se fait à l'aide du PhosphorImager par coloration au bromure d'éthidium. Les fragments d'intérêts sont purifiés à l'aide de membranes Whatman DE81. La concentration et la qualité de l'ADN sont ensuite déterminées par gel d'agarose 1,5 % à l'aide du marqueur de poids moléculaire de faible masse (Invitrogen).

2.5 Insertion des fragments du promoteur du hGIP-R dans le vecteur luciférase pGL-3 Basic

2.5.1 Préparation du vecteur

Les fragments du promoteur du hGIP-R sont clonés dans le vecteur pGL-3 Basic à l'aide de la technique Gateway. La technique Gateway consiste à cloner des fragments par l'intermédiaire de sites de recombinaison. Le fragment

d'intérêt remplace alors dans le vecteur une cassette B nécessaire au clonage. Cette cassette de 1 713 pb contient un gène de résistance au chloramphénicol et le gène *ccdb* qui inhibe la croissance des bactéries à l'exception de la souche *E.coli* DB3.1.

La cassette B est insérée dans la région de clonage multiple du vecteur pGL-3 Basic aux sites *Xho*I (32 pb) et *Bgl*II (36 pb). L'orientation de la cassette est ensuite vérifiée par digestion, puis l'intégrité des sites de recombinaison est vérifiée par séquençage automatique. L'activité luciféase du vecteur modifié est également vérifiée afin de s'assurer qu'elle est identique à celle du vecteur de base. Le vecteur pGL-3 Basic Gateway est ensuite linéarisé à l'aide de l'enzyme *Eco*RI dont le site de restriction est localisé dans la cassette B.

2.5.2 Insertion des fragments dans le vecteur gwpGL-3 Basic

L'insertion des fragments dans le vecteur gwpGL-3 Basic se fait en deux étapes. Dans un premier temps, le fragment de PCR qui contient les sites de recombinaison *Att*B1 et *Att*B2 est transféré dans le vecteur d'échange pDONR201 qui contient les sites de recombinaison *Att*P1 et *Att*P2, par recombinaison des sites B et P, dans un volume final de 25 µl (1 µg produit PCR ; 1 X tampon BP ; 300 ng vecteur pDONR201 ; 5 u BP) pendant 1 h à 25°C. Cette réaction conduit à la formation de nouveaux sites de recombinaison, les sites *Att*L1 et *Att*L2. Le vecteur d'échange pDONR201 contenant le fragment de PCR est ensuite mis en présence du vecteur pGL-3 Basic gateway qui contient les sites de recombinaison *Att*R1 et *Att*R2 dans un volume final de 25 µl (15 µl réaction BP ; 3 mM NaCl ; 250 ng gwpGL-3 Basic / *Eco*RI ; 5 u LR) pendant 1 h à 25°C afin de produire la construction finale.

2.5.3 Insertion des fragments mCaRE dans le vecteur pGL-3 promoter

Les fragments du promoteur du GIP-R contenant les éléments de réponse mCaRE sont clonés dans le vecteur pGL-3 promoter à l'aide de site de restriction *Eco*RI et *Eco*RV. L'amplification par PCR a été réalisée à l'aide d'amorces

spécifiques pour chacune des régions du promoteur auxquelles ont été ajoutés les nucléotides spécifiques pour les sites EcoRI et EcoRV. Le produit de PCR est digéré à l'aide des enzymes de restriction EcoRI et EcoRV (tampon one phor all 1 X ; 5 u EcoRI ; 5 u EcoRV ; 750 ng produit de PCR), puis incubé 2 h à 25°C en présence du vecteur pGL-3 promoter préalablement linéarisé à l'aide des mêmes enzymes (tampon ligase 1 X ; 0,25 mM ATP ; 100 ng vecteur ; 250 ng PCR ; 1 u ligase). Le produit de ligation est ensuite transformé dans les *E.coli* de souche DH5 α .

2.5.4 Insertion des fragments inhibiteurs dans le vecteur pGL-3 promoter

Pour la construction GIPR_{prom}-422/-390, les fragments du promoteur ont été obtenus de Invitrogen (sens 5' aattgagactgtggctgtctgggtgtgaccatgggac^{3'} ; anti-sens 5' atatgtcccatggtcacaccagacagccacagtctc^{3'}) appariés 1 h et clonés dans le vecteur pGL-3 promoter à l'aide des sites de restriction EcoRI et EcoRV, tel que décrit à la section 2.5.3.

2.5.5 Digestion et séquençage

L'identité des fragments clonés est confirmée à l'aide d'enzymes spécifiques qui libèrent des fragments de tailles précises, puis la séquence exacte de chaque fragment est déterminée par séquençage automatique afin de s'assurer qu'aucune mutation n'a été introduite lors des manipulations.

2.6 Transfections

2.6.1 Transfection des fragments proximaux du hGIPR

Les cellules HeLa et HGT-1 (250 000) sont mises en culture dans des plaques 30 mm et incubées 24 h dans du DMEM⁺ supplémenté avec 10 % de FBS et 100 μ g/ml des antibiotiques pénicilline et streptomycine. Les constructions (1 μ g) sont co-transfectées de manière transitoire avec le vecteur RSV β -gal (1 μ g) par précipitation au phosphate de calcium (125 mM CaCl₂ ; BBS 1 X). Les milieux sont changés 4 h après la transfection. Les activités luciférase et β -gal sont lues 48 h après la transfection. L'activité luciférase est normalisée avec

l'activité β -gal et exprimée en nombre de fois le vecteur contrôle (gwpGL-3 Basic). Les résultats représentent la moyenne de 3 essais indépendants réalisés en triplicatas.

2.6.2 Transfection des éléments nCaRE

Les cellules HeLa et HGT-1 (250 000) sont mises en culture dans des plaques 30 mm et incubées 24 h dans du DMEM⁺ supplémenté avec 10 % de FBS et 100 μ g/ml des antibiotiques pénicilline et streptomycine. Les constructions (5 μ g) sont co-transfectées de manière transitoire avec le vecteur RSV β -gal (1 μ g) par précipitation au phosphate de calcium (125 mM CaCl₂ ; BBS 1 X). Les milieux sont changés 4 h après la transfection et remplacés par du DMEM⁺ supplémenté avec 10 % de FBS, 100 μ g/ml des antibiotiques pénicilline et streptomycine et 0,3 mM ou 2,5 mM CaCl₂. Les activités luciférase et β -gal sont lues 48 h après la transfection. L'activité luciférase est normalisée avec l'activité β -gal. Les résultats représentent la moyenne de 2 essais indépendants réalisés en duplicatas.

2.6.3 Transfection des fragments inhibiteurs

Les cellules HeLa et HGT-1 (250 000) sont mises en culture dans des plaques 30 mm et incubées 24 h dans du DMEM⁺ supplémenté avec 10 % de FBS et 100 μ g/ml des antibiotiques pénicilline et streptomycine. Les constructions (1 μ g) sont co-transfectées de manière transitoire avec le vecteur RSV β -gal (1 μ g) par précipitation au phosphate de calcium (125 mM CaCl₂ ; BBS 1 X). Les milieux sont changés 4 h après la transfection. Les activités luciférase et β -gal sont lues 48 h après la transfection. L'activité luciférase est normalisée avec l'activité β -gal et exprimée en nombre de fois le vecteur contrôle pGL-3 promoter. Les résultats représentent la moyenne de 3 essais indépendants réalisés en triplicatas.

2.7 Retardement sur gel

2.7.1 Extraits nucléaires cellulaires

Les extraits nucléaires isolés à partir de lignées cellulaires sont préparés selon le protocole proposé par Andrew (Andrew et al., 1991). Brièvement, les cellules sont lavées avec du PBS 1 X puis recueillies dans 1,2 ml de PBS. Une centrifugation de 10 secondes permet de récupérer le culot de cellules qui est ensuite suspendu dans 400 µl de solution A (10 mM HEPES pH 7,9 ; 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ; 0,5 mM DTT ; 0,2 mM PMSF ; 938 µl H₂O), puis incubé 10 min dans un bain de glace. Le mélange est ensuite agité par Vortex 10 s puis centrifugé 10 s. Le culot est ensuite suspendu dans 20 µl à 100 µl de solution B (25 % glycérol ; 20 mM HEPES pH 7,9 ; 420 mM NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 0,2 mM PMSF ; 556 µl H₂O). Finalement le mélange est centrifugé 2 min à 4°C puis le surnageant est récupéré et congelé à -80°C. La concentration protéique est déterminée à l'aide du DC protein assay (BioRad).

2.7.2 Extraits nucléaires tissulaires

Le protocole utilisé pour isoler les extraits nucléaires à partir de tissus congelés, est une adaptation de la technique proposée par Deryckere et Gannon (Deryckere et Gannon, 1994). 500 mg de tissu sont réduits en poudre, homogénéisés dans 5 ml de solution A (10 mM Hepes ; 150 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 0,6 % NP-40 ; 0,5 mM PMSF) puis centrifugés 30 s à 2000 rpm. Le surnageant est ensuite récupéré et incubé dans un bain de glace pendant 5 min, puis de nouveau centrifugé 5 min à 5000 rpm. Le culot est alors suspendu dans 250 µl de solution B (25 % glycérol ; 20 mM HEPES ; 420 mM NaCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,2 mM EDTA ; 0,5 mM DTT ; 0,2 mM PMSF ; 5 µg aprotinine, 5 µg de leupeptine ; 5 µg de pepstatine) et incubé sur glace 20 minutes. Le mélange est alors centrifugé 30 s à 10 000 rpm et le surnageant est récupéré et congelé à -80°C. Toutes les centrifugations se déroulent à 4°C. La concentration protéique est déterminée à l'aide du DC protein assay (BioRad).

2.7.3 Migration des échantillons

2.7.3.1 Identification des sites de liaison

Six sondes contenant chacune une boîte GC ou GT (Tableau 2,3) sont marquées au ^{32}P dCTP avec l'enzyme Klenow. La réaction se fait dans un volume de 30 μl (2,5 μg extraits nucléaires ; 100 000 CPM sonde ; 24 mM HEPES ; 3 mM MgCl_2 ; 70 mM KCl ; 24 % glycerol ; 3 mM DTT ; 600 μg BSA ; 1 μg poly (dI-dC)), à la température de la pièce durant 30 min.

Tableau 2.3. Sondes utilisées pour les essais de retardement sur gel.

SONDE	SÉQUENCE (5' → 3')
-254 / -232 (s)	<i>tctgggagtgccggtggggcggttacctgtgggtggg</i>
-254 / -232 (as)	<i>gggaatccccaccacaggtaccgccccaccgccactc</i>
-90 / -71 (s)	<i>tctgggttcctgtcccgcttggcc</i>
-90 / -71 (as)	<i>gggaatcggccaagcgaggacagggaac</i>
-75 / -53 (s)	<i>tctggccttggccccgccccctccatcac</i>
-75 / -53 (as)	<i>gggaatcgtgatgggagggcggggccaagg</i>
-64 / -41 (s)	<i>tctggctccatcaccccggtgcccagcg</i>
-64 / -41 (as)	<i>gggaatcgtggtgagcccggtgatgggag</i>
-161 / -138 (s)	<i>tctggccctccctcatgacctgatgactgccccctg</i>
-161 / -138 (as)	<i>gggaatccaggggagtcagtcaggtcatgaggagg</i>
-238 / -218 (s)	<i>tctggacctgtgggtgggacagca</i>
-238 / -218 (as)	<i>gggaatctggtgtccaccacaggt</i>

Gras / italique : sites de marquage

Lorsqu'un anticorps ou une sonde compétitrice non radioactive est inclus dans la réaction, l'extrait nucléaire est préalablement incubé 15 min à la température de la pièce, en présence de l'anticorps ou de la sonde non radioactive, avant l'addition de la sonde radioactive. La compétition non-spécifique se fait à l'aide d'une sonde contenant une séquence d'ADN de bactérie sens (5' tctggaaggggatccgtgtacacaggaagtgacaatttc^{3'}) et anti-sens (5' gggaatcgaattgtcacttcctgtgtacacggatcccccttcaga^{3'}). Les compétitions spécifiques se font à l'aide de sondes qui contiennent la même séquence que la sonde sauvage, mais avec des nucléotides mutés au niveau du site de liaison potentiel (Tableau 2,4). Les complexes sont séparés sur un gel de polyacrylamide 4 % non-dénaturant 0,5 X TBE (0,04 mM Tris ; 0,04 mM acide borique ; 0,01 mM EDTA pH 8,0). La détection est réalisée au PhosphorImager

après 24 h d'exposition. Le serum pré-immun est utilisé comme contrôle (Santa Cruz sc-2043). L'anticorps Sp3 (D20) (sc-644), de même que l'anticorps Sp1 (PEP2) (sc-59) (Santa Cruz) sont utilisés.

Tableau 2.4. Sondes mutées utilisées pour les essais de retardement sur gel.

SONDE	SÉQUENCE (5' → 3')
-254 / -232 (s)	<i>ictgggagtgccggtggggaagggtacctgtgggtggg</i>
-254 / -232 (as)	<i>gggaatccccaccacaggtaccctccccaccgccactc</i>
-90 / -71 (s)	<i>ictgggttcctgtcaagccttgcc</i>
-90 / -71 (as)	<i>gggaatcggccaaggcttgacagggaac</i>
-75 / -53 (s)	<i>ictggccttgccaagaaccctcccatcac</i>
-75 / -53 (as)	<i>gggaatcgtgatgggaggggttcttgccaagg</i>
-64 / -41 (s)	<i>ictggctcccatcaccaatggctgccagcg</i>
-64 / -41 (as)	<i>gggaatccgctggcagccattggtgtatgggag</i>
-161 / -138 (s)	<i>ictggacctgtggaaaggacagca</i>
-161 / -138 (as)	<i>gggaatctgctgtcctttccacaggt</i>
-238 / -218 (s)	<i>ictggccaaacctcatgacctgat</i>
-238 / -218 (as)	<i>gggaatcatcaagggtcatgaggtttgg</i>

Gras / italique : sites de marquage ; Gras : nucléotides mutés

2.7.3.2 Comparaison des complexes observés à l'aide d'extraits nucléaires GIPR⁺ et GIPR⁻

Trois sondes comprenant la région 0 à -100 pb (-1 pb à -40 pb ; -30 pb à -70 pb et -60 pb à -100 pb) (Tableau 2,5) sont marquées au ³²P dCTP avec l'enzyme Klenow. La réaction se fait dans un volume final de 30 µl (2,5 µg extraits nucléaires ; 100 000 CPM sonde ; 24 mM HEPES ; 3 mM MgCl₂ ; 70 mM KCl ; 24 % glycerol ; 3 mM DTT ; 600 µg BSA ; 1 µg poly (dI-dc)), à la température de la pièce pendant 30 min. Lorsqu'un anticorps ou une sonde compétitrice non radioactive est inclus dans la réaction, l'extrait nucléaire est préalablement incubé 15 minutes à température pièce en présence de l'anticorps ou de la sonde non radioactive avant l'addition de la sonde radioactive. La compétition non-spécifique se fait à l'aide d'une sonde contenant une séquence d'ADN de bactérie sens (5' tctggaaggggatccgtgtacacaggaagtgacaattttc3') et anti-sens (5' gggaatcgaaaattgtcacttcctgtgtacacggatccccttcaga3'). Les complexes sont séparés sur un gel de polyacrylamide 4 % non-dénaturant 0,5 X TBE (0,04 mM Tris ; 0,04 mM acide borique ; 0,01 mM EDTA pH 8,0). La détection est réalisée au PhosphorImager après 24h d'exposition. Le serum pré-immun est

utilisé comme contrôle (Santa Cruz sc-2043). L'anticorps Sp3 (D20) (sc-644), de même que l'anticorps Sp1 (PEP2) (sc-59) (Santa Cruz) sont utilisés.

SONDE	SÉQUENCE 5' → 3'
0 / -40 (s)	<i>tc</i> ttgg gcgcctgtcacctctccagagccgagacaaggcagtgga
0 / -40 (as)	<i>ggg</i> aat ctccactgccttgtctcggctctgggagagggtgacaggcgc
-30 / -70 (s)	<i>tc</i> ttgg ccccccccctccatcaccgccggctgccagcgcctgtca
-30 / -70 (as)	<i>ggg</i> aat ctgacaggcgcctggcagccccggggtgatggagggggcggg
-60 / -100 (s)	<i>tc</i> ttgg ccccgcctccgttccctgtccgccttggccccgcccccct
-60 / -100 (as)	<i>ggg</i> aat cagggggcggggccaagcgggacagggaacggaagcggg

2.7.3.3 Caractérisation des éléments nCaRE

est utilisé comme contrôle (Santa Cruz sc-2043). La détection est réalisée au PhosphorImager après 24 h d'exposition.

2.7.3.4 Caractérisation du fragment inhibiteur

Deux sondes comprenant la région -422 à -500 (sens 5'tctgggagactgtggctgtctctgggtgtgacctgggactgtatggg^{3'} et anti-sens 5'gggaatccccatacagtcctcatgggtcacaccagagacagccacagtctc^{3'}) et la région -500 à -550 (sens 5'tctgggtactgtgtgtgtgcaggagtccatagccctgggtaca^{3'} et anti-sens 5'gggaatctgtaccagggtatggactcctgcacacacacagtaa^{3'}) sont marquées au $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP avec l'enzyme Klenow. La réaction se fait dans un volume de 30 μl (2,5 μg extraits nucléaires ; 100 000 CPM sonde ; 24 mM HEPES ; 3 mM MgCl_2 ; 70 mM KCl ; 24 % glycerol ; 3 mM DTT ; 600 μg BSA ; 1 μg poly (dI-dc)) et est incubée 30 min à température de la pièce. Lorsqu'une sonde compétitrice non radioactive est incluse dans la réaction, l'extrait nucléaire est préalablement incubé 15 min à température de la pièce en présence de la sonde non radioactive avant l'addition de la sonde radioactive. La compétition non-spécifique et la migration se font tel que décrit à la section 2.7.3.2.

2.8 Expression des facteurs de transcription SP1, Sp3 et CRSP9

2.8.1 Expression du facteur de transcription Sp1

2.8.1.1 Amplification par PCR multiplex

Les amorces Sp1 sens (5'tgccaccatgagcgaccaag^{3'}) et Sp1 anti-sens (5'tgagagtacattattagcca^{3'}) sont utilisées pour amplifier le facteur de transcription Sp1 (région 92 pb à 838 pb) à l'aide de la polymérase à ADN TAQ dans un volume finale de 25 μl (1 X tampon TAQ ; 0,4 μM amorce sens ; 0,4 μM amorce anti-sens ; 0,2 μM amorces 18S ; 0,2 mM dNTPs ; 2 mM MgCl_2 ; 2 μl RT ; 0,05 u TAQ). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 15 s à 52°C, 20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont séparés dans un gel d'agarose 1,5% et quantifiés au phosphorImager. Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne du ratio gène candidat /

18S +/- écart type. Les résultats représentent la moyenne de 3 essais indépendants. Un test de Student été utilisé pour l'analyse statistique et un $p < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. L'intervalle de linéarité pour chaque réaction de PCR est déterminé tel que décrit dans le protocole d'Ambion pour le Quantum RNA 18S internal standards.

2.8.1.2 Buvarpage de Western

25 μ g d'extraits nucléaires (section 2.7.1) sont déposés sur un gel de polyacrylamide. L'hybridation primaire se fait dans du TBS / lait 5 % / tween 0,1 % en présence de l'anticorps de souris anti-Sp1 (D20) IgG1 monoclonal (Santa Cruz sc-420) dilué 1 : 100 et de l'anticorps de souris anti- γ -tubuline 1 : 1 000 (Santa Cruz) durant 16h à 4°C. L'hybridation secondaire se fait en présence de l'anticorps anti-souris conjugué HRP dilué 1 : 5000 (Santa Cruz sc-2005) dans la même solution pendant 1 h à la température de la pièce. La révélation se fait par exposition en présence de luminol. L'intensité de la bande spécifique au facteur de transcription Sp1 (106 kDa) est normalisée avec l'intensité de la bande pour la γ -tubuline (50 kDa).

2.8.2 Expression du facteur de transcription Sp3

2.8.2.1 Amplification par PCR multiplex

Les amorces Sp3 sens ($5'$ aagtctatgggaagacctca $3'$) et Sp3 anti-sens ($5'$ gtacatagttaacctaat $3'$) sont utilisées pour amplifier le facteur de transcription Sp3 (région 2 053 pb à 3 055 pb) à l'aide de la polymérase à ADN TAQ dans un volume finale de 25 μ l (1 X tampon TAQ ; 0,3 μ M amorce sens ; 0,3 μ M amorce anti-sens ; 0,2 μ M amorces 18S ; 0,2 mM dNTPs ; 2 mM $MgCl_2$; 2 μ l RT ; 0,05 u TAQ). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 20 s à 52°C, 20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1,5% et quantifiés au phosphorImager. Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne du ratio gène candidat / 18S +/- écart type. Les résultats représentent la moyenne de 3

essais indépendants. Un test de Student été utilisé pour l'analyse statistique et un $p < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif. L'intervalle de linéarité pour chaque réaction de PCR a été déterminé tel que décrit dans le protocole d'Ambion pour le Quantum RNA 18S internal standards.

2.8.2.2 Buvarpage de Western

25 μ g d'extraits nucléaires (section 2.7.1) sont déposés sur un gel de polyacrylamide. L'hybridation primaire se fait dans du TBS / lait 5 % / tween 0,5 % en présence de l'anticorps de lapin anti-Sp3 (D20) IgG polyclonal (Santa Cruz sc-644) dilué 1 : 250, durant 16 h à 4°C. L'hybridation secondaire se fait en présence de l'anticorps anti-lapin conjugué HRP (santa cruz sc-2004) dilué 1 : 5000 dans la même solution, pendant 1 h à la température de la pièce. La révélation se fait à l'aide de la solution de 4-chloro naphtol (sigma) ou par exposition en présence de luminol. L'intensité des deux bandes spécifiques au facteur de transcription Sp3 (79 kDa et 108 kDa) est normalisée avec l'intensité de la bande pour la γ -tubuline (50 kDa).

2.8.3 Expression du facteur de transcription CRSP₃₃

2.8.3.1 Amplification par PCR multiplex

Les amorces CRSP₃₃ sens (5' *taccagtgtaaagccaga* 3') et CRSP₃₃ anti-sens (5' *catctcatcaattaggaca* 3') sont utilisées pour amplifier le co-facteur CRSP₃₃ (région 22 pb à 750 pb) à l'aide de la polymérase à ADN TAQ dans un volume finale de 25 μ l (1 X tampon TAQ ; 0,3 μ M amorce sens ; 0,3 μ M amorce anti-sens ; 0,2 μ M amorces 18S ; 0,2 mM dNTPs ; 1,5 mM MgCl₂ ; 2 μ l RT ; 0,05 u TAQ). La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (15 s à 95°C, 20 s à 56°C, 20 s à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1,5% et quantifiés au phosphorImager. Les résultats sont exprimés sous forme de la moyenne du ratio gène candidat / 18S +/- écart type. Les résultats représentent la moyenne de 3 essais indépendants. Un test de Student été utilisé pour l'analyse statistique et un $p < 0,05$ est considéré comme

statistiquement significatif. L'intervalle de linéarité pour chaque réaction de PCR a été déterminé tel que décrit dans le protocole d'Ambion pour le Quantum RNA 18S internal standards.

2.9 Séquençage de la région d'acétylation de Sp3

Les amorces sens (5' ctctgacgcctgttcaaacc3') et anti-sens (5' acgcagatgagctctcagatg3') sont utilisées pour amplifier le facteur de transcription Sp3 à l'aide de la polymérase à ADN TAQ dans un volume finale de 25 µl (1 X tampon TAQ ; 0,2 µM amorce sens ; 0,2 µM amorce anti-sens ; 0,2 µM amorces 18S ; 0,2 mM dNTPs ; 2 mM MgCl₂ ; 2 µl RT ; 0,05 u TAQ), sur l'ADNc d'échantillons de tissu surrénalien provenant de 4 patients avec syndrome de Cushing dépendant du GIP (AIMAH), 2 patients avec maladie de Cushing et 2 patients ayant subi une néphrectomie radicale complète. La réaction de PCR consiste en une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, suivie d'une amplification de 30 cycles (10 secondes à 95°C, 10 secondes à 55°C et 10 secondes à 72°C) et d'une élongation finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR sont chargés sur un gel d'agarose 1,5 % et la détection se fait à l'aide du PhosphorImager par coloration au bromure d'éthidium. Les fragments d'intérêt sont purifiés à l'aide de membranes Whatman DE81. La concentration et la qualité de l'ADN sont ensuite déterminées par gel d'agarose 1,5 % à l'aide de l'échelle de poids moléculaire 100 pb (Invitrogen). Les fragments sont séquencés par séquençage automatique et la séquence obtenue est comparée à la séquence contrôle à l'aide du logiciel GenSolve (Stratagene).

CHAPITRE 3

RÉSULTATS



3. Résultats

3.1 Analyse de la séquence nucléotidique du promoteur du hGIPR

L'expression ectopique d'une protéine peut s'expliquer par une multitude d'événements génétiques. Parmi ces événements, il y a la translocation chromosomique du gène en aval d'un promoteur spécifique à un type cellulaire donné. L'expression ectopique d'une protéine peut aussi s'expliquer par l'insertion d'une ou de plusieurs mutations dans son promoteur, mutations qui peuvent modifier la liaison de facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression du gène. Enfin, l'expression ectopique d'une protéine peut aussi impliquer directement une mutation des facteurs de transcriptions responsables de la régulation de l'expression du gène, ou de leurs co-facteurs.

Chez les patients atteints d'un syndrome de Cushing dépendant du GIP étudiés jusqu'à présent, aucun cas de translocation chromosomique n'a été observé. Nous avons donc procédé à l'analyse de la séquence nucléotidique du promoteur du GIP-R à la recherche de mutations ou de polymorphismes dans la séquence promotrice située de -9 kb en amont du site d'initiation de la transcription à 1,3 kb en aval (Antonini et al., 2004). Pour ce faire, nous avons d'abord procédé au séquençage du promoteur sur une distance de 800 pb en amont du site d'initiation de la transcription de même qu'au séquençage de l'exon 1 et de l'intron 1 à partir d'ADN provenant de tissus surrénaliens de 9 patients atteints d'un syndrome de Cushing dépendant du GIP, de 1 patient atteint de la maladie de Cushing, de 1 patient atteint d'un syndrome de Cushing dépendant de la vasopressine, ainsi qu'à partir d'ADN leucocytaire provenant de 9 contrôles sains.

L'analyse de cette région nous a permis d'identifier trois variations (Tableau 3,1). Tout d'abord, un polymorphisme est observé à la position -4/-5. La séquence du promoteur du GIPR publiée sur GenBank (AC006132) révèle la

présence de deux T à cette position. Cependant, les résultats que nous avons obtenus montrent que 5 de nos 9 patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP possèdent un seul T à cette position, alors que les 4 autres patients sont hétérozygotes et présentent une insertion d'un T sur un des deux allèles. La présence d'une séquence double T homozygote tel que décrite dans GenBank à cette position n'a été observée chez aucun de nos patients. Le séquençage de l'ADN contrôle a révélé la même distribution génomique (4/9 contrôles homozygotes T/T et 5/9 contrôles hétérozygotes T/TT).

Une deuxième variation a été identifiée au nucléotide 102 où une substitution d'un T pour un C est observée chez tous les patients et contrôles. L'insertion d'un G à la position 895 a également été observée chez tous les patients et contrôles, ce qui suggère que ces deux variations sont probablement le résultat d'une erreur dans la séquence publiée par GenBank et non des SNP.

Tableau 3,1. Variations nucléotidiques observées dans la région -800 pb à 1 233 pb.

LOCALISATION	VARIATION	FRÉQUENCE
		4/9 patients
		hétérozygotes (T/TT)
-4/-5	insertion d'un T	5/9 patients homozygotes (T)
		5/9 contrôles hétérozygotes (T/TT)
		4/9 contrôles homozygotes (T/T)
102	substitution T → C	9/9 patients
		9/9 contrôles
895	insertion d'un G	9/9 patients
		9/9 contrôles

Le séquençage de la région distale du promoteur du hGIP-R (-800 pb à -9 kb) a été réalisé sur l'ADN leucocytaire des 9 contrôles et sur l'ADN des tissus surrénaliens chez 4 des 9 patients (Tableau 3,2). Au total 8 polymorphismes ont été identifiés dans cette région, tous des substitutions (C → T à la position -7 220 ; A → T à la position -5142 ; G → T à la position -5 130 ; G → A aux positions -5 127 et -4 016 ; G → C aux positions -3 166, -3 000 et -2 964). Les polymorphismes identifiés aux positions -7 220, -4 016, -3 166, -3 000 et -2 964 semblent fréquemment observés (>50%) aussi bien chez les patients que

chez les contrôles. Cependant, les polymorphismes identifiés aux positions -5 130, -5 127 semblent beaucoup moins fréquents (<20%). Finalement, le polymorphisme identifié à la position -5 142 était moins fréquent chez les patients (30%) que chez les contrôles (100%).

Nous avons également observé que les polymorphismes identifiés aux positions -7 220, -3 00 et -2 964 sont situés dans des séquences de types Alu, alors que les polymorphismes identifiés aux positions -5 142, -5 130 et -5 127 sont situés à l'intérieur de microsatellites de type A₃₋₁₆. Finalement, les polymorphismes identifiés aux positions -3 000 et -2 964 et qui sont situés dans des séquences de type Alu sont aussi localisés à l'intérieur d'un des quatre îlots CpG potentiels (-1 / -200 ; -2 900 / -3 200 ; -3 700 / -4 200 ; -6 040 / -6 720), mais ces nucléotides ne sont pas inclus dans un dinucléotide CpG.

Tableau 3.2. Polymorphismes identifiés dans le promoteur distal du hGIP-R

POLYMORPHISME	GÉNOTYPES			ALLÈLES	
-7220	CC	CT	TT	C	T
GIP-AIMAH	33	0	67	33	67
Contrôle	33	22	45	44	56
-5142	AA	AT	TT	A	T
GIP-AIMAH	67	33	0	92	8
Contrôle	0	78	22	39	61
-5130	GG	GT	TT	G	T
GIP-AIMAH	80	20	0	95	5
Contrôle	89	11	0	94	6
-5127	GG	GA	AA	G	A
GIP-AIMAH	80	20	0	95	5
Contrôle	89	11	0	94	6
-4016	GG	GA	AA	G	A
GIP-AIMAH	0	17	83	8	92
Contrôle	0	44	56	22	78
-3166	GG	GC	CC	G	C
GIP-AIMAH	0	100	0	50	50
Contrôle	33	45	22	56	44
-3000	GG	GC	CC	G	C
GIP-AIMAH	0	40	60	20	80
Contrôle	0	11	89	6	96
-2964	GG	GC	CC	G	C
GIP-AIMAH	0	33	67	7	83
Contrôle	0	44	56	22	78

Le séquençage de la région distale du promoteur du hGIPR n'a été réalisé que chez un petit nombre de patients. Cependant, la fréquence des polymorphismes étant similaire chez les patients et chez les contrôles, et les polymorphismes identifiés n'étant localisés dans aucun élément de réponse potentiel, il est plus que probable que ces polymorphismes soient sans lien avec la maladie.

3.2 Expression de l'ARNm du GIPR dans les tissus humains

La distribution de l'ARNm du GIP-R dans les tissus humains a été déterminée à l'aide d'une membrane commerciale contenant 65 tissus adultes et sept tissus fœtaux (Baldacchino et al., 2005). Dans les tissus adultes (Figure 3,1 A ; colonnes A à I ; membrane du haut), l'expression maximale est observée dans le pancréas et la trachée. Le GIPR est aussi détecté, dans une moindre mesure, dans les différentes régions du cerveau, du cœur et du tractus gastro-intestinal, de même que dans la rate, le thymus, le poumon, le rein et les cellules sanguines. Aucun signal n'est visible pour l'utérus, le foie, le placenta, les testicules et les glandes surrénales.

Dans les tissus fœtaux (figure 3,1 A ; colonne J ; membrane du haut), le GIPR est observé dans le poumon, le cœur et le rein, mais pas dans le cerveau, le foie, la rate et le thymus, ce qui suggère que bien qu'également très présent dans les tissus fœtaux, la distribution tissulaire de l'ARNm du GIPR pourrait être différente chez le fœtus et l'adulte.

La membrane contient également l'ARNm de huit lignées cellulaires (HL-60, HeLa, K-562, MOLT-4, Raji, Daudi, SW480 et A549) ce qui nous a permis de montrer que l'ARNm du GIP-R est présent dans les cellules cancéreuses de la leucémie myéloïde chronique (K-562), de même que dans les cellules d'un lymphome de Burkitt (Daudi et Raji). Par contre, il n'est pas exprimé dans les cellules cancéreuses utérines de type HeLa, dans les cellules issues d'un carcinome de poumon (A549), d'un adénocarcinome colorectal (SW480), ainsi

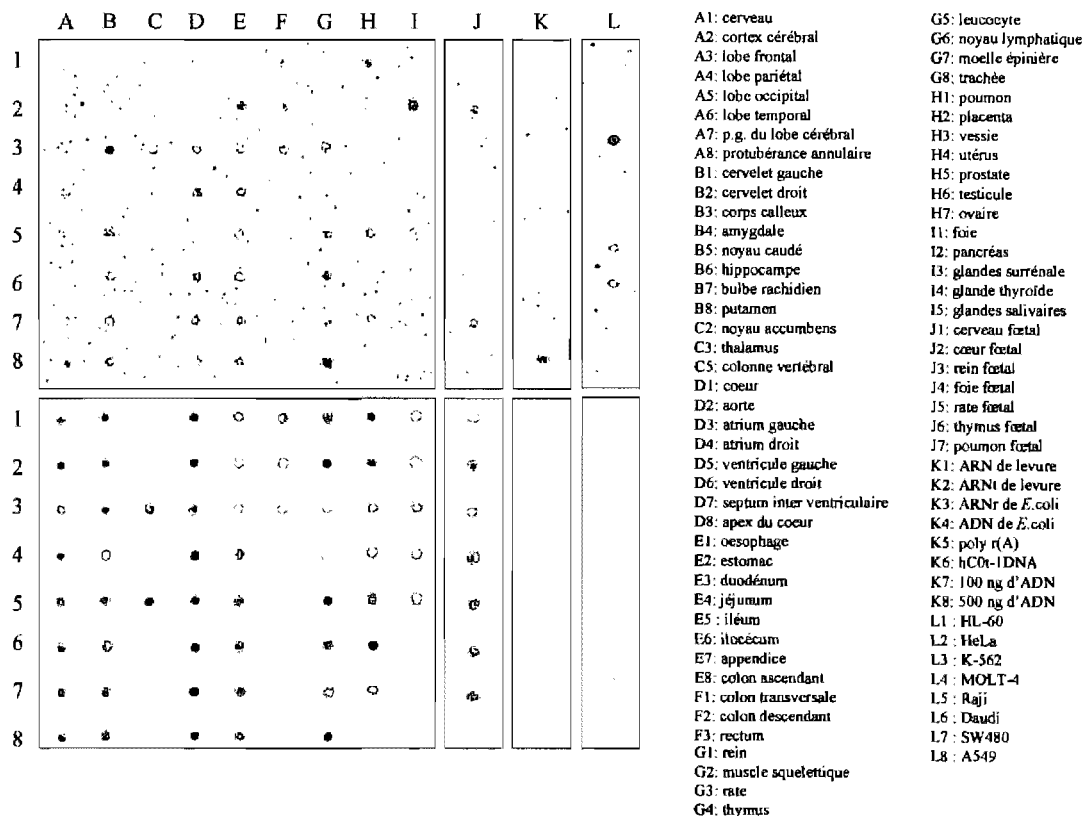
que dans les cellules sanguines provenant d'un patient atteint d'une leucémie promyélocitique (HL-60) et d'une leucémie lymphoblastique (MOLT-4).

La spécificité de la sonde a été démontrée par l'absence de signal dans les échantillons contrôles (Figure 3,1 A ; colonne K ; membrane du haut). La membrane a également été hybridée avec une sonde ubiquitine comme contrôle (Figure 3,1 A ; membrane du bas).

Les résultats obtenus lors de l'hybridation de la membrane ont été confirmés par PCR semi-quantitative (Figure 3,1 B). Deux bandes à 545 et 456 pb, correspondant aux deux isoformes du GIPR, sont clairement visibles dans le pancréas, le cerveau, la trachée, le rein et le petit intestin, tout comme sur la membrane. Un très faible signal est observé dans les glandes surrénales, de même que dans le cortex surrénalien. Une paire d'amorces spécifiques pour le 18S permettant d'amplifier un fragment de 336 pb a été utilisée comme contrôle.

A)

Légende



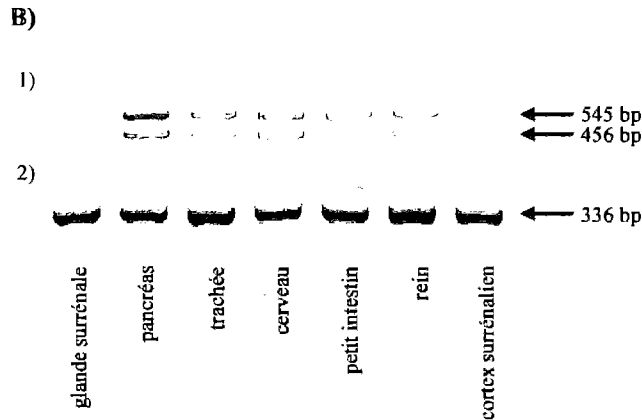


Figure 3,1. Distribution tissulaire de l'ARNm du GIPR chez l'adulte et le fœtus humain. A) Membrane commerciale. L'hybridation de la sonde GIPR (membrane du haut) est réalisée à 68°C pendant 1 h, puis la membrane est révélée au PhosphorImager après 24 h d'exposition. L'hybridation de la sonde ubiquitine (membrane du bas) est réalisée à 68°C pendant 1 h puis la membrane est révélée au PhosphorImager après 2 h d'exposition. B) PCR semi-quantitative. L'ARNm est réversement transcrit et amplifié par PCR multiplex à l'aide des sondes GIPR et 18S. L'expérience a été réalisée en duplicat lors de trois essais indépendants.

3.3 Identification des facteurs de transcription capables de lier la région proximale du promoteur du hGIPR

3.3.1 Expression du GIP-R dans les lignées cellulaires humaines

Dans un premier temps, l'expression de l'ARNm du GIPR dans des lignées cellulaires humaines a été vérifiée par PCR multiplex afin d'identifier une lignée qui exprime fortement le GIPR et une lignée qui ne l'exprime pas, ou peu (Baldacchino et al., 2005). Les deux bandes à 545 et 456 pb sont observées dans les HGT-1 et les HT-29. Les deux bandes sont également faiblement visibles dans les HEK 293 et les HepG2, alors qu'aucun signal n'est observé dans les HeLa. Une paire d'amorces spécifiques pour le 18S permettant d'amplifier un fragment de 336 pb a été utilisée comme contrôle (Figure 3,2). Les résultats obtenus ont été confirmés par PCR en temps réel (Antoine Lampron, résultats non publiés). De plus, l'absence du GIPR dans les HeLa a été constatée avec la membrane commerciale (Figure 3,1 A ; colonne L ; membrane du haut), alors que la présence du GIPR fonctionnel a été largement décrite dans les HGT-1 (Gespach C et al., 1984 ; Emami S et al., 1986).

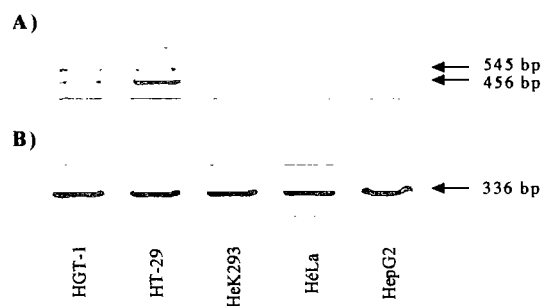


Figure 3,2. *Expression de l'ARNm du GIPR dans les lignées cellulaires humaines.* L'ARNm est réversement transcrit à l'aide de la M-MLV-RT et amplifié par PCR multiplex à l'aide des amorces GIPR et 18S. L'expérience a été réalisée en duplicat lors de trois essais indépendants.

3.3.2 Transfection des fragments de délétion du promoteur du hGIPR dans les HGT-1

La séquence de l'ARNm du GIPR et de son promoteur est disponible sur GeneBank (NM000164 et AC006132). La localisation exacte du site d'initiation de la transcription n'est pas connue, mais nous avons utilisé le premier nucléotide de l'ARNm comme point de départ (Figure 3,4). Pour identifier les régions impliquées dans la régulation de l'expression du GIP-R, des fragments de délétion du promoteur du hGIP-R jusqu'à une distance de -2 000 pb, ont été transfectés dans les HGT-1 (Baldacchino et al., 2005). La transfection des fragments situés entre -2 000 pb et -595 bp dans les HGT-1 montre une activité luciférase d'environ quatre à cinq fois supérieure à l'activité du vecteur contrôle gwpGL-3 Basic. La transfection du fragment -473 entraîne une baisse de l'activité au niveau du vecteur contrôle, ce qui suggère la présence d'un élément de réponse activateur entre les nucléotides -473 et -595 pb. Une délétion subséquente jusqu'à -336 pb entraîne une augmentation de l'activité luciférase dans les HGT-1, ce qui suggère la présence d'un site de liaison pour un facteur de transcription inhibiteur entre -336 et -422 pb. L'activité est maintenue suite à des délétions jusqu'à -100 pb, alors qu'une délétion jusqu'à -49 pb inhibe complètement l'activité luciférase (Figure 3,3).

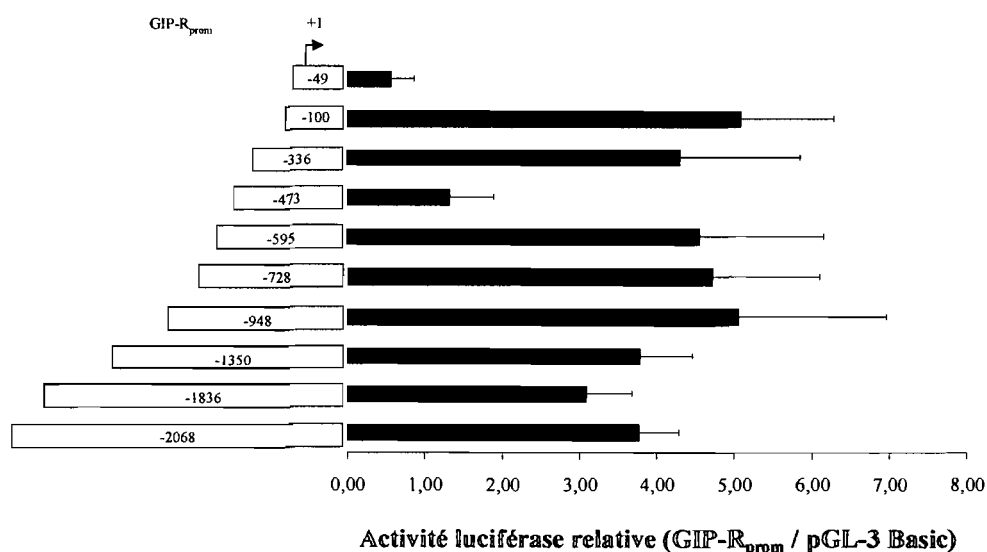


Figure 3.3. *Analyse fonctionnelle du promoteur du gène codant pour le hGI-R.* Les fragments du promoteur du hGIPR sont co-transfectés de manière transitoire avec un vecteur RSV β -gal. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas avec leur écart type et sont rapportés en fonction de leur activité par rapport à l'activité du vecteur contrôle gwpGL-3 Basic.

3.3.3 Analyse de la région proximale du hGIPR

L'analyse de la région promotrice proximale du GIP-R (Baldacchino et al., 2005) montre un promoteur riche en nucléotides G et C et dépourvu de boîte TATA. La région comprise entre les nucléotides -1 et -350 contient cependant de nombreuses boîtes GC / GT, souvent impliquées dans la liaison de régulateurs de la transcription. Trois de ces six boîtes sont localisées dans les 100 premiers nucléotides (GC-48/-53), (GC-65/-70) et (GC-77/-82) alors que les trois autres boîtes sont localisées à -150/-156 (GT-150/-156), -223/-229 (GT-223/-229) et -237/-242 (GC-237/-242) (Figure 3,4).

-350 -300
GCTTGTGAGGTTCTGTGACTGTGCCTTTCCATGGCTCAGCCTATGGGATTGTGTGTGACACTGCATGTTTGATTGAGTGACTG

-250 AA AAA -200
AGGCTCTGGGAATGAGTGGCGGTGGGGGCGGGTACCTGTGGGTGGGACAGCATGAGAGATTGTACACACTTGGTGCAGGG
GC-237/-232 GT-229/-223

-150
AAA
GTCCTCAGGACGATAAGGACAATTCAGTAAGTGCCTCCCTCATGACCTTGATGACTGCCCCCTGCTCGGCTCTCTGCCCCA
GT-156/-150

-100 AA AA AA AAT -50
GAGCTCCCCGCTTCCGTTCCCTGTCCCGCCTTGGCCCCGCCCCCTCCCATCACCCCGGGCTGCCAGCGCCTGTCACCTCTC
GC-82/-77 GC-70/-65 GC-53/-48

+1
CCAGAGCCGAGACAAGGCAAGTGGAGgagcaggtggcaggggctgcaggagcaagtgaaccaggagcaggactggggacaggtgagggctccccaatcc

Figure 3,4. Analyse de la région proximale du hGIPR. Les boîtes GC et GT sont soulignées et les nucléotides mutés sont identifiés au-dessus de chaque site.

3.3.4 Transfection des fragments de délétion du promoteur proximal du hGIPR dans les HGT-1

Afin de déterminer l'effet de chacune des boîtes GC / GT sur l'activité du promoteur du GIPR, des fragments contenant un nombre croissant de boîtes ont d'abord été transfectés dans les HGT-1 (Baldacchino et al., 2005). Tel que mentionné précédemment, aucune activité luciférase n'est observée dans la région 0/-49 qui ne contient aucun élément de réponse potentiel, de même que dans la région 0/-66, qui contient la boîte GC-48/-53. L'ajout de la boîte GC-65/-70 (construction GIPR-75) entraîne une activité luciférase importante. La présence de deux autres boîtes, GC-77/-82 et GT-150/-156 (constructions GIPR-100 et GIPR-160), augmente aussi l'activité luciférase, mais de manière moins importante. L'activité maximale est d'ailleurs observée avec la construction GIPR-160. L'ajout de la seconde boîte GT (GT-223/-229) semble diminuer de manière assez importante l'activité du promoteur, mais la dernière boîte (GC-237/-242) semble permettre de retrouver une activité quasi maximale (Figure 3,5).

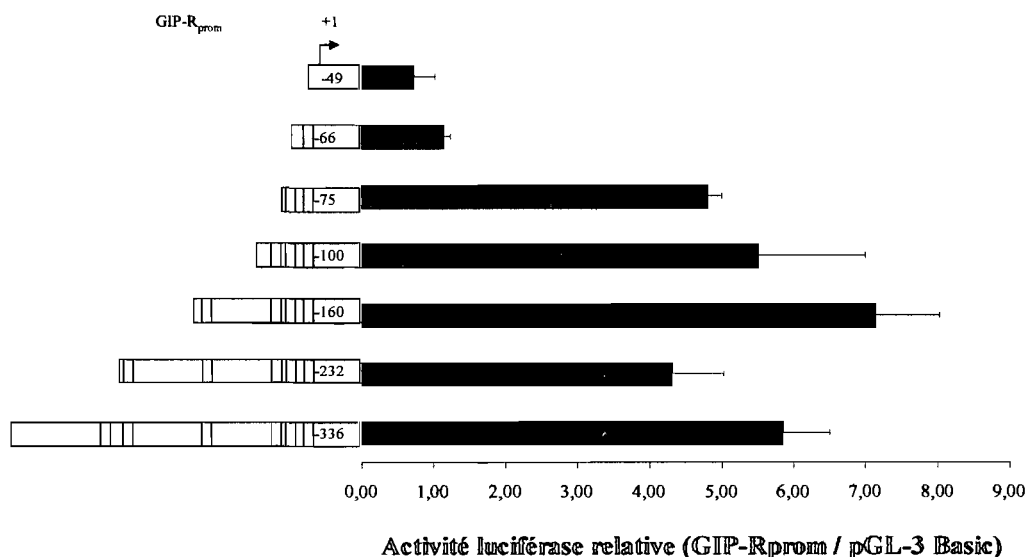


Figure 3.5. Analyse fonctionnelle du promoteur du gène codant pour le hGIPR. Les fragments du promoteur sont co-transfectés de manière transitoire avec un vecteur RSV β -gal. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas avec leur écart type et sont rapportés en fonction de leur activité par rapport à l'activité du vecteur contrôle gwpGL-3 Basic

3.3.5 Transfection de fragments mutés du promoteur du hGIPR dans les HGT-1

L'effet de chacune des boîtes GC / GT sur l'activité luciférase a également été observée lors de la transfection de constructions dans lesquelles des mutations ponctuelles de chacune des boîtes ont été introduites (Baldacchino et al., 2005). Une mutation de la boîte GC-48/-53 entraîne l'abolition presque totale de l'activité luciférase dans les HGT-1, inhibition qui est également observée lorsque le site GC-65/-70 est muté. La mutation de la boîte GT-223/-229 augmente l'activité du promoteur d'environ 180 %, ce qui est en accord avec les résultats précédents qui montraient une baisse de l'activité du promoteur lors de l'ajout de ce site. Étonnamment, la mutation des boîtes GC-77/-82, GT-150/-156 et GC-237/-242 entraîne aussi une augmentation de l'activité luciférase dans les HGT-1 (165 %, 210 % et 140 % respectivement), ce qui semble contredire les effets observés précédemment où l'on pouvait voir une augmentation de l'activité luciférase lors de l'ajout de ces sites (Figure 3,6). Ces

résultats discordants semblent suggérer une interaction possible de ces sites dans la régulation de l'expression de l'ARNm du hGIPR.

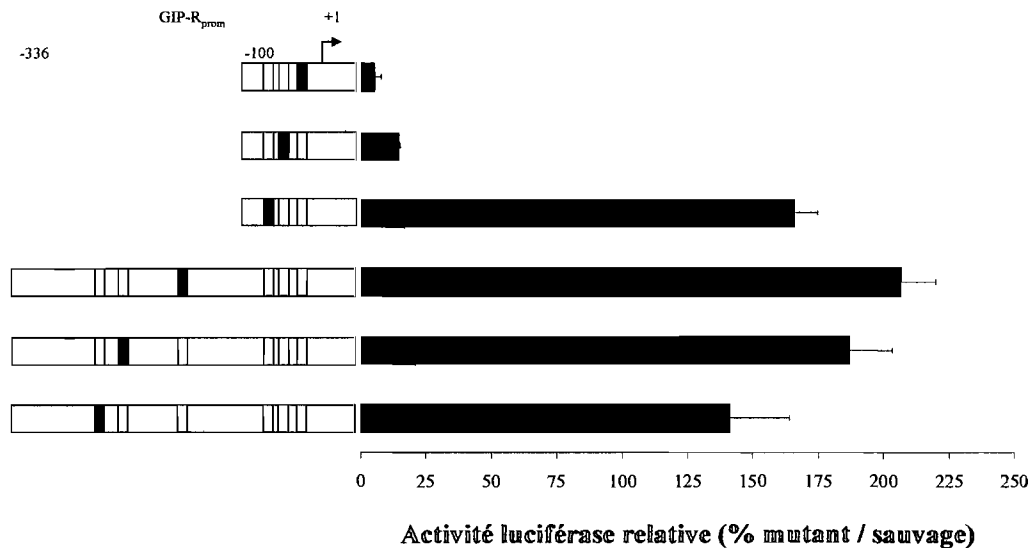


Figure 3.6. Analyse fonctionnelle du promoteur du gène codant pour le hGIPR à l'aide de fragments mutés. Les fragments du promoteur sont co-transfectés de manière transitoire avec un vecteur RSV β -gal. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas avec leur écart type et sont rapportés en pourcentage d'activité de la construction sauvage.

3.3.6 Retardement sur gel

Les boîtes GC et GT sont connues pour lier les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. La capacité des boîtes GC et GT présentes dans le promoteur proximal du GIP-R à lier Sp1 et Sp3 a été déterminée par retardement sur gel. Chaque sonde, qui contient une des boîtes GC ou GT, a été incubée en présence d'extraits nucléaires provenant de cellules HGT-1. Les complexes sont ensuite résolus sur un gel de polyacrylamide. Le gel est exposé durant 16 h au PhosphoImager (Baldacchino et al., 2005). Nous observons la formation de quatre complexes en présence de la sonde GT-223/-229 (Figure 3,7 D ; colonne 1) et de la sonde GC-48/-53 (résultats non publiés), cinq complexes avec la sonde GC-77/-82 (Figure 3,7 B ; colonne 1) et six complexes en présence des sondes GC-237/-232

(Figure 3,7 E ; colonne 1), GC-65/-70 (Figure 3,7 A ; colonne 1) et GT-150/-156 (Figure 3,7 C ; colonne 1).

Les complexes 1, 2 et 3 sont facilement déplacés par l'ajout d'une quantité croissante de sonde non radioactive et un excès de 100 X abolit complètement la liaison de tous les complexes (Figure 3,7 A à E ; colonne 2), alors qu'un excès de 100 X d'une sonde non radioactive non spécifique ne déplace pas les complexes (Figure 3,7 A à E ; colonne 3). L'ajout d'un anticorps anti-Sp1 provoque un retard ou l'abolition du complexe C1 en présence de toutes les sondes (Figure 3,7 A à E ; colonne 4), à l'exception de la sonde GC-48/-53 (résultats non publiés).

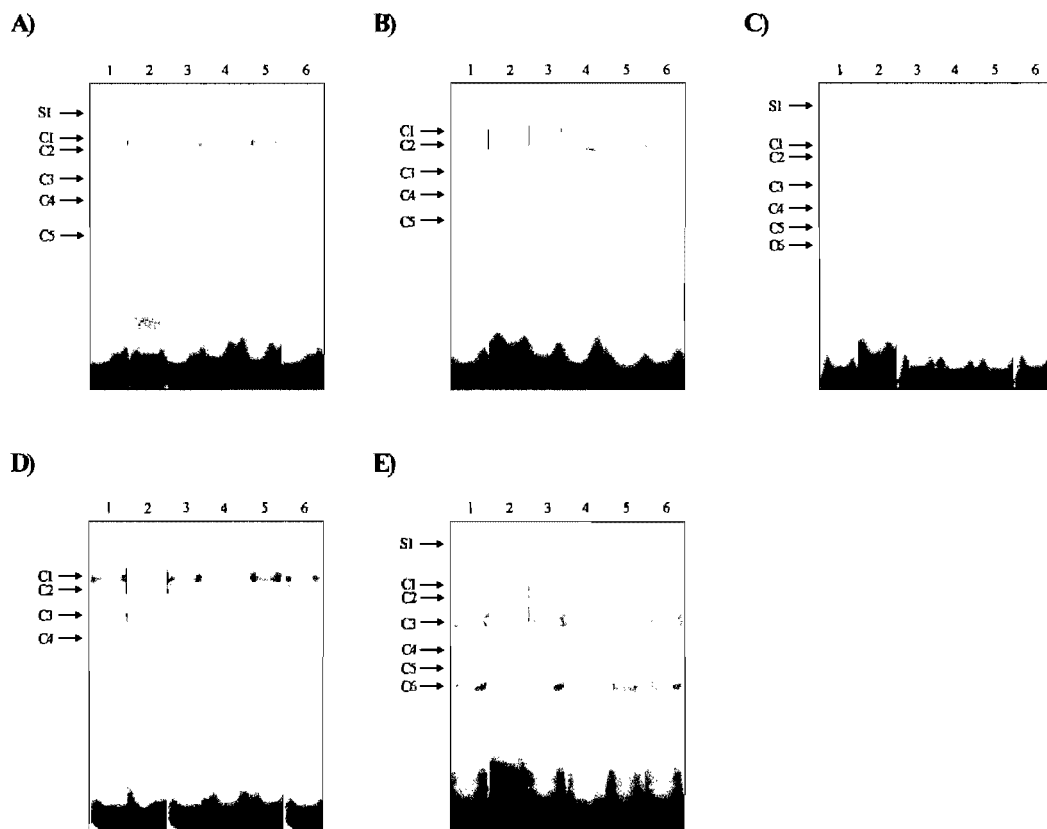


Figure 3,7. Profil de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3. Six sondes contenant chacune une boîte GC ou GT ont été marquées avec du ^{32}P dCTP et incubées en présence d'extraits nucléaires isolés à partir des HGT-1, puis migrées sur gel de polyacrylamide. (1) : extraits nucléaires HGT-1 ; (2) : compétition spécifique 100 X ; (3) : compétition non spécifique 100 X ; (4) : anticorps anti-Sp1 ; (5) : anticorps anti-Sp3 ; (6) : sérum pré-immun. A) sonde GC-65/-70 B) sonde GC -77/-82 C) sonde GT-150/-156 D) sonde -223/-229 E) sonde -237/-242.

La présence du facteur de transcription Sp1 dans le complexe C1 est confirmée par la formation d'un complexe qui migre à la même distance que le complexe C1 suite à l'incubation de la protéine recombinante Sp1 en présence d'une sonde Sp1 sauvage (Figure 3,8 colonne 7). La protéine Sp1 recombinante ne lie pas la sonde Sp1 mutante (Figure 3,8 colonne 6).

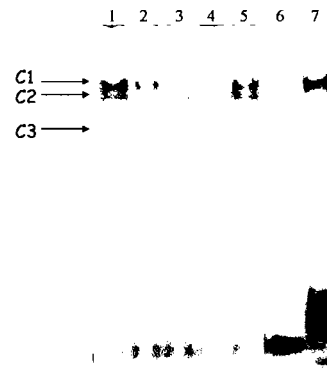


Figure 3,8. *Contrôle de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3.* (1) : sonde Sp1 sauvage incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 ; (2) : sonde Sp1 sauvage incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 et de l'anticorps anti-Sp3 ; (3) : sonde Sp1 sauvage incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 et de l'anticorps anti-Sp1 ; (4) : sonde Sp1 mutante incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 (5) : sonde Sp1 sauvage incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 et du sérum pré-immun (6) : sonde Sp1 mutante incubée en présence de la protéine recombinante Sp1 et (7) : sonde Sp1 sauvage incubée en présence de la protéine Sp1 recombinante.

L'ajout d'un anticorps anti-Sp3 bloque la formation des complexes 2 et 3 en présence de toutes les sondes, à l'exception de la sonde GC-48/-53 (Figure 3,7 A à E ; colonne 5). Le déplacement de deux complexes différents en présence de l'anticorps anti-Sp3 suggère la présence des deux isoformes Sp3 (long et court) dont le poids moléculaire est respectivement de 125 KDa et 80 KDa. La présence du facteur de transcription Sp3 dans les complexes C2 et C3 n'a cependant pas pu être confirmée à l'aide de la sonde sauvage et mutante, puisqu'aucune protéine Sp3 recombinante n'est actuellement disponible.

Finalement, la pré-incubation de chacune des sondes avec le sérum pré-immun n'a pas d'effet sur la formation des complexes ((Figure 3,7 A à E ; colonne 6),

ce qui démontre la spécificité de la liaison entre l'anticorps et les complexes C1, C2 et C3. De plus, les extraits nucléaires HGT-1 ont été incubés en présence des sondes GC-48/-53, GC-65/-70, GC-77/-82, GT-150/-156, GT-223/-229 et GC-237/-232 dont les nucléotides spécifiques de la boîte GC ou GT ont été préalablement mutés. Aucun complexe n'est observé en présence de ces sondes (résultats non publiés), ce qui confirme que ces nucléotides sont bel et bien importants pour la formation des complexes. Enfin, les complexes C4, C5 et C6 sont aussi observés lors de l'incubation de la sonde Sp1 sauvage en présence d'extraits nucléaires HGT-1 et semblent plus difficilement déplacés, ce qui suggère que ces complexes ne sont pas ou peu spécifiques.

3.3.7 Comparaison de l'activité luciférase des fragments de délétion du promoteur proximal du hGIP-R dans les HGT-1 et les HeLa

Afin de déterminer si les résultats obtenus lors des transfections dans les HGT-1 sont également observés dans les HeLa, qui n'expriment pas le GIP-R, des fragments de délétion du promoteur du GIP-R situés entre -2000 pb et -49 bp ont été transfectés dans ces cellules (Figure 3,9). Quelle que soit la construction utilisée, l'activité luciférase observée dans les HeLa n'est jamais supérieure à 1,5 fois le niveau de l'activité luciférase pour le vecteur contrôle gwpGL-3 Basic, ce qui suggère que des activateurs essentiels à l'activité du promoteur sont absents dans les HeLa, ou que des répresseurs qui ne sont pas silencieux dans les HGT-1 sont exprimés dans les HeLa.

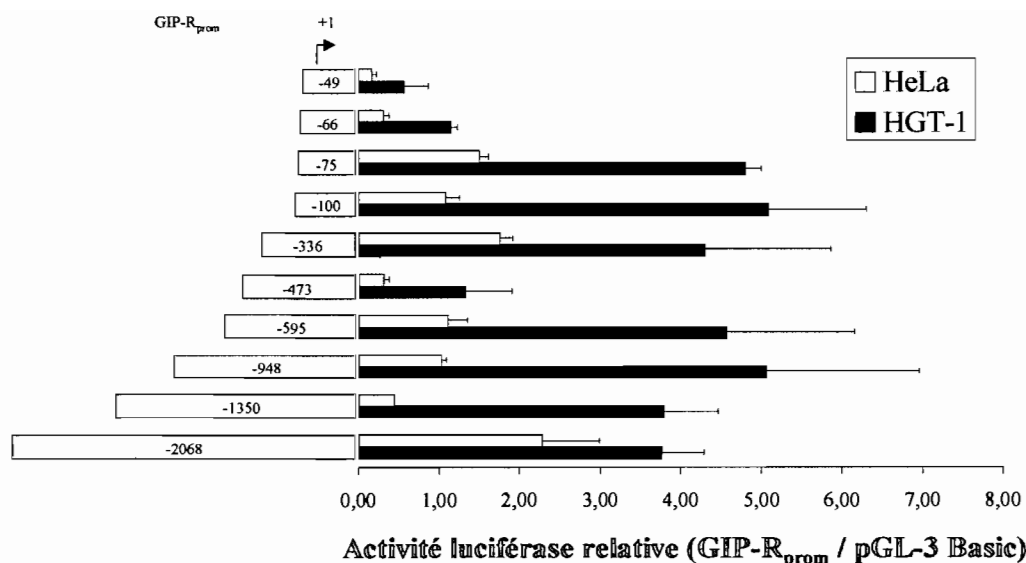


Figure 3,9. Comparaison de l'activité du promoteur du hGIPR dans les HGT-1 et les HeLa. Les fragments du promoteur sont co-transfectés de manière transitoire avec un vecteur RSV β -gal. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas avec leur écart type et sont rapportés en fonction de leur activité par rapport à l'activité du vecteur contrôle gwpGL-3 Basic.

3.3.8 Expression des facteurs de transcription Sp1, Sp3 et CRSP₃₃

Les variations d'activité luciférase dans les HGT-1 et les HeLa semblent suggérer que la région 0/-100 est suffisante pour induire une différence au niveau de l'activité du promoteur. Or cette région lie les facteurs de transcription Sp1 et Sp3. Afin de déterminer si des différences au niveau de l'expression de ces facteurs de transcription existent dans les HGT-1 et les HeLa, et si ces différences pourraient être responsables de l'expression ectopique du GIPR chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP, le niveau d'expression de l'ARNm et des protéines des facteurs Sp1 et Sp3 a été mesuré par PCR semi-quantitatif et par immunobuvardage de Western. Le niveau d'ARNm du co-facteur CRSP₃₃, qui est nécessaire à l'activité du facteur de transcription Sp1 a également été mesuré.

3.3.8.1 Expression du GIPR

La présence du GIPR dans les HGT-1 ou son absence dans les HeLa a déjà été démontrée précédemment (Figure 3,2). De même, la présence ou l'absence du GIPR dans les échantillons de tissus surrénaliens des patients utilisés dans cette étude a été documentée dans la littérature et seuls deux cas pour chacune des catégories sont présentés ici. Le niveau d'expression de l'ARNm du GIPR est élevé chez les patients traités pour un syndrome de Cushing dépendant du GIP (Figure 3,10). À l'opposé, le niveau d'expression de l'ARNm du GIPR est très faible, voir indétectable, dans les tissus surrénaliens des patients traités pour une maladie de Cushing, un adénome surrénalien sans expression ectopique du GIPR, ou un carcinome surrénalien, de même que dans les tissus surrénaliens des contrôles sains.

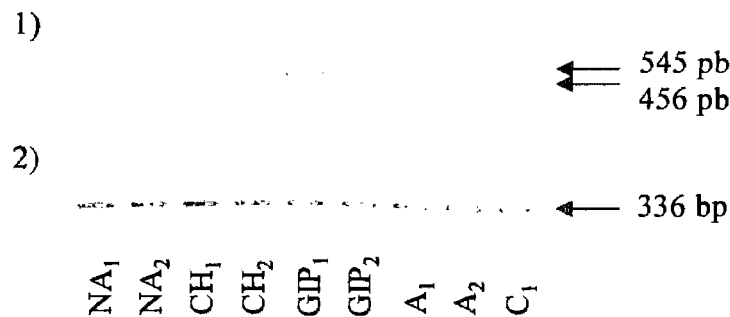


Figure 3,10. Expression de l'ARNm du GIPR dans les tissus surrénaliens humains. L'ARNm est réversement transcrit à l'aide de la M-MLV-RT et amplifié par PCR multiplex à l'aide des amorces GIPR et 18S. NA : surrénale normale ; CH : maladie de Cushing ; GIP : Cushing GIP ; A : adénome ; C : carcinome.

3.3.8.2 Expression des facteurs de transcription Sp1, Sp3 et du co-facteur CRSP₃₃ dans les HGT-1 et les HeLa

Les résultats présentés à la figure 3,11 montrent que le niveau d'ARNm des facteurs de transcription Sp1 et Sp3, de même que du co-facteur CRSP₃₃ est le même dans les HGT-1 et dans les HeLa. Une paire d'amorces spécifiques pour le 18S permettant d'amplifier un fragment de 336 pb a été utilisée comme contrôle.

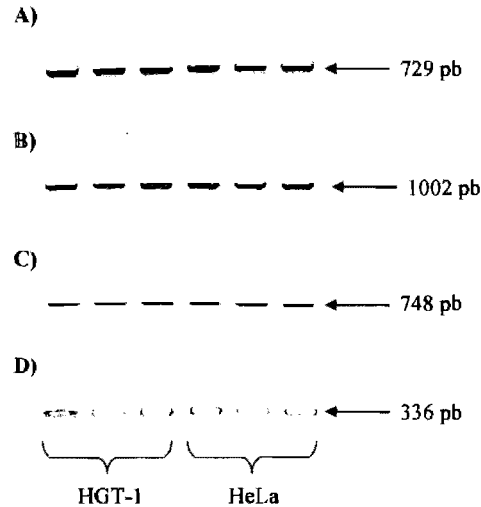


Figure 3,11. Niveau d'expression de l'ARNm des facteurs de transcription *Sp1* et *Sp3* et du co-facteur *CRSP₃₃* dans les lignées cellulaires *HGT-1* et *HeLa*. L'ARN est réversement transcrit et amplifié par PCR multiplex à l'aide soit d'une paire d'amorces spécifiques pour le facteur de transcription *Sp1* capable d'amplifier un fragment de 729 pb (A), d'une paire d'amorces spécifiques pour le facteur de transcription *Sp3* capable d'amplifier un fragment de 1002 pb (B), d'une paire d'amorces spécifiques pour le co-facteur *CRSP₃₃* et capable d'amplifier un fragment de 748 pb (C) et d'une paire d'amorces spécifiques pour le 18S et capable d'amplifier un fragment de 336 pb (D).

Par ailleurs, l'immunobuvardage de Western en présence de l'anticorps anti-*Sp1* montre la présence d'une bande spécifique à 106 kDa. Bien que la protéine *Sp1* semble légèrement plus abondante dans les *HGT-1*, cette différence n'est pas statistiquement significative, ce qui suggère que le niveau de *Sp1* est le même dans les *HGT-1* et dans les *HeLa* (Figure 3,12 A). De même, aucune différence n'est observée au niveau protéique pour le facteur de transcription *Sp3* (Figure 3,12 B) et ses isoformes (135 kDa, 125 kDa, 84 kDa et 79 kDa). Ces deux résultats suggèrent que le niveau d'expression des facteurs de transcription *Sp1* et *Sp3* n'est pas impliqué dans la différence d'activité observée lors de la transfection du promoteur du hGIP-R dans les *HGT-1* et les *HeLa*.

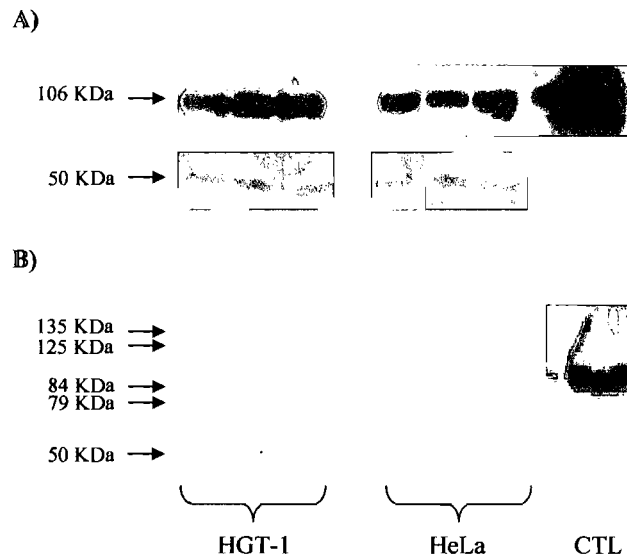


Figure 3,12. Niveau d'expression protéique des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 dans les lignées cellulaires HGT-1 et HeLa. Les protéines nucléaires sont migrées sur gel de polyacrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose puis hybridées en présence des anticorps anti-Sp1 (A) ou anti-Sp3 (B). Un anticorps anti- γ -tubuline (50 kDa) est utilisé comme contrôle

3.3.8.3 Niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp1 dans les échantillons de tissus surrénaliens humains

Le niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp1 dans la surrénale des patients (7 Cushing surrénaliens dépendant du GIP, 7 Cushing hypophysaires, 7 adénomes unilatéraux sans expression ectopique du GIPR et 2 carcinomes) a été mesuré par PCR semi-quantitative (Baldacchino et al., 2005). Une paire d'amorce spécifique pour le 18S permettant d'amplifier un fragment de 336 pb a été utilisée comme contrôle. Une bande à 729 pb correspondant au facteur de transcription Sp1 est clairement visible pour tous les échantillons. Cependant, aucune différence du niveau d'expression n'ayant été observée suite à une quantification au PhosphorImager, seuls les résultats obtenus avec l'ARNm de neuf patients sont présentés ici (Figure 3,13).

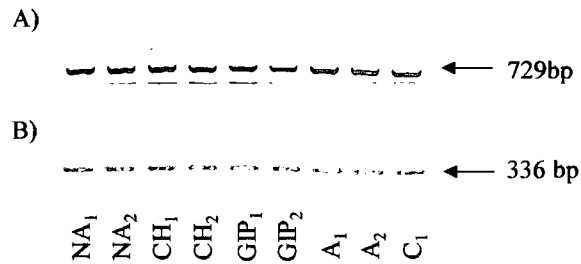


Figure 3,13. Niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp1 dans les échantillons de tissus surrénaliens humains. L'ARN est réversement transcrit et amplifié par PCR multiplex à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques pour le facteur de transcription Sp1 capable d'amplifier un fragment de 729 pb (A) et d'une paire d'amorces spécifiques pour le 18S capable d'amplifier un fragment de 336 pb (B). NA : surrénale normale ; CH : maladie de Cushing ; GIP : Cushing GIP ; A : adénome ; C : carcinome.

Par ailleurs, l'immunobuvardage de Western en présence de l'anticorps anti-Sp1 montre la présence d'une bande spécifique à 106 kDa. Le niveau d'expression protéique de Sp1 varie pour chacun des échantillons, ce qui s'explique probablement par le fait que certains échantillons soient plus anciens que d'autres. Cependant, la normalisation à l'aide de l'anticorps anti- γ -tubuline permet de démontrer que le niveau d'expression est le même pour tous les échantillons (3,14).

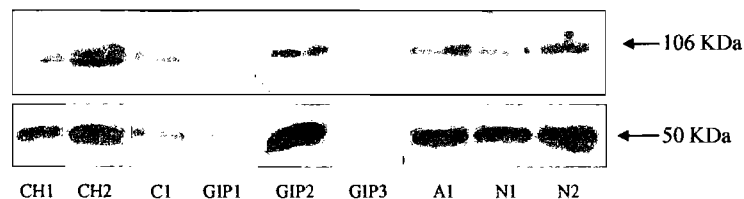


Figure 3,14. Niveau d'expression protéique du facteur de transcription Sp1 dans les échantillons de tissus surrénaliens. Les protéines nucléaires sont migrées sur gel de polyacrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose puis hybridées en présence des anticorps anti-Sp1 (106 kDa). Un anticorps anti- γ -tubuline (50 kDa) est utilisé comme contrôle.

Les résultats obtenus autant pour l'expression de l'ARNm que pour l'expression protéique montrent que le niveau d'expression du facteur de transcription Sp1 n'est pas responsable de l'expression ectopique du GIP-R chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

3.3.8.4 Niveau d'expression du facteur de transcription Sp3 dans les échantillons de tissus surrénaliens humains

Le niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp3 dans la surrénale des patients (7 Cushing surrénalien dépendant du GIP, 7 Cushing hypophysaires, 7 adénomes unilatéraux sans expression ectopique du GIP-R et 2 carcinomes) a été mesuré par PCR semi-quantitative (Baldacchino et al., 2005). Une paire d'amorces spécifiques pour le 18S a été utilisée comme contrôle. Le niveau d'expression de l'ARNm de Sp3 a été dosé à l'aide du PhosphorImager et les résultats sont présentés sous forme de ratio Sp3/18S. Le niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp3 est augmenté de 1,5 fois environ chez tous les patients traités pour un syndrome de Cushing dépendant du GIP. Cependant, la même augmentation est également observée chez 4 des 7 patients traités pour une maladie de Cushing et chez 3 des 7 patients traités pour un adénome surrénalien (Figure 3,15). L'ARNm du facteur de transcription Sp3 est donc bel et bien surexprimé chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP, mais cette différence d'expression n'est pas spécifique à ce type de patients. Ce résultat exclut donc la possibilité que Sp3 puisse être responsable de l'expression ectopique du GIP-R dans le tissu surrénalien des patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

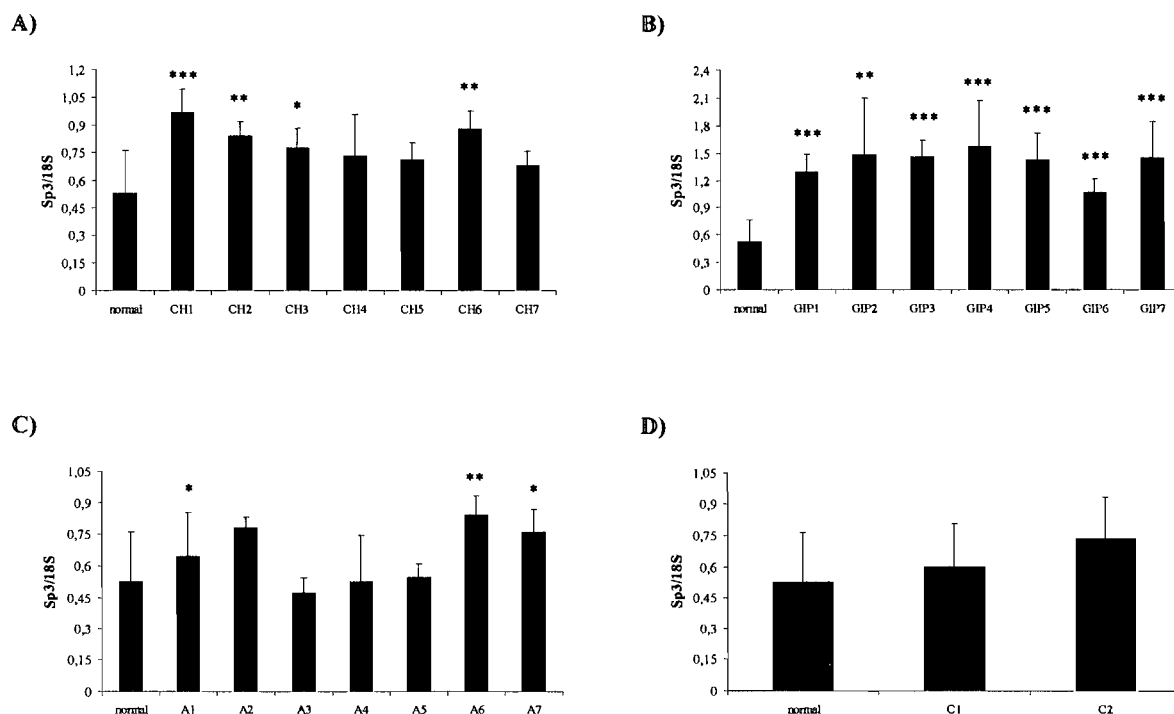


Figure 3,15. Niveau d'expression de l'ARNm du facteur de transcription Sp3 dans les échantillons de tissus surrénaliens humains. L'ARNm est réversement transcrit et amplifié par PCR multiplex à l'aide des amorces spécifiques Sp3 et 18S. Les résultats, exprimés sous la forme d'un ratio Sp3 / 18S, représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas et de leur écart type. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test t de student et un p-valeur de $\leq 0,05$ est considéré comme significatif (* $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$ *** $\leq 0,001$) A) échantillons de tissus surrénaliens provenant de patients traités pour une maladie de Cushing hypophysaire B) échantillons de tissus surrénaliens provenant de patients traités pour un syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP C) échantillons de tissus surrénaliens provenant de patients traités pour un adénome surrénalien non dépendant du GIP D) échantillons de tissus surrénaliens provenant de patients traités pour un carcinome surrénalien.

Par ailleurs, l'immunobuvardage de Western en présence de l'anticorps anti-Sp3 montre la présence d'une bande spécifique à 135 kDa, qui correspond à l'isoforme long de Sp3. Les isoformes tronqués (84 kDa et 79 kDa) ne sont pas ou peu visibles, probablement parce que leur expression est trop faible. Bien que l'expression de l'ARNm de Sp3 semblait plus élevée chez les patients que chez les contrôles sains, l'expression protéique semble la même (Figure 3,16). Cependant, ces essais ont été réalisés à l'aide de protéines nucléaires isolées à partir d'échantillons de tissus congelés depuis plusieurs mois et il est possible que l'action des nucléases ait endommagée le contenu protéique, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre le niveau d'ARN et le niveau de protéines.

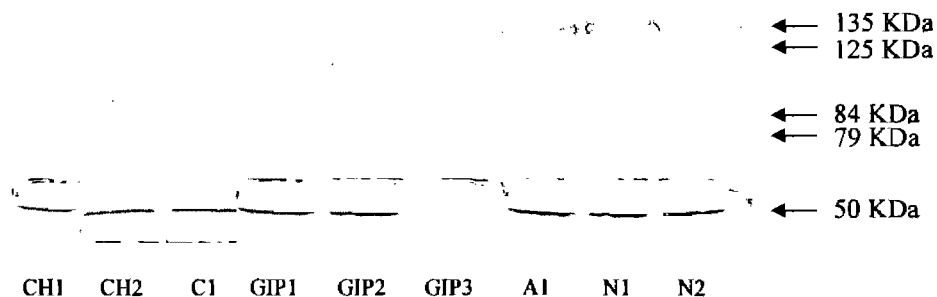


Figure 3,16. Niveau d'expression protéique du facteur de transcription Sp3 dans les échantillons de tissu surrénalien. Les protéines nucléaires sont migrées sur gel de polyacrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose puis hybridées en présence des anticorps anti-Sp3 (135 kDa, 125 kDa, 84 kDa et 79 kDa). Un anticorps anti- γ -tubuline (50 kDa) est utilisé comme contrôle.

L'expression protéique de Sp3 ne semble pas corroborer les résultats obtenus pour l'ARNm. Cependant, des différences étant observées chez tous les patients, il est clair que le niveau d'expression du facteur de transcription Sp3 n'est pas impliqué dans l'expression ectopique du GIPR chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

3.3.8.5 Niveau d'expression de l'ARNm du co-facteur CRSP₃₃ dans les échantillons de tissus surrénaliens

Le niveau d'expression de l'ARNm du co-facteur CRSP₃₃ dans la surrénale des patients (7 Cushing surrénaliens dépendant du GIP, 7 maladies de Cushing, 7 adénomes unilatéraux sans expression ectopique du GIP-R et 2 carcinomes) a été mesuré par PCR semi-quantitative (Baldacchino et al., 2005). Une paire d'amorces spécifiques pour le 18S a été utilisée comme contrôle. Le niveau d'expression de l'ARNm de CRSP₃₃ a été dosé à l'aide du phosphorImager et les résultats sont présentés sous forme de ratio CRSP₃₃/18S. Le niveau d'expression de l'ARNm du co-facteur CRSP₃₃ est augmenté de 1,5 fois environ chez les patients traités pour un syndrome de Cushing dépendant du GIP. Cependant, la même augmentation est également observée chez 4 des 7 patients traités pour un syndrome de Cushing hypophysaire (Figure 3,17). Tout comme pour le facteur de transcription Sp3, il est donc peu probable que la différence d'expression de l'ARNm du co-facteur CRSP₃₃ puisse être impliquée dans l'expression ectopique du GIPR dans le tissu surrénalien des patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

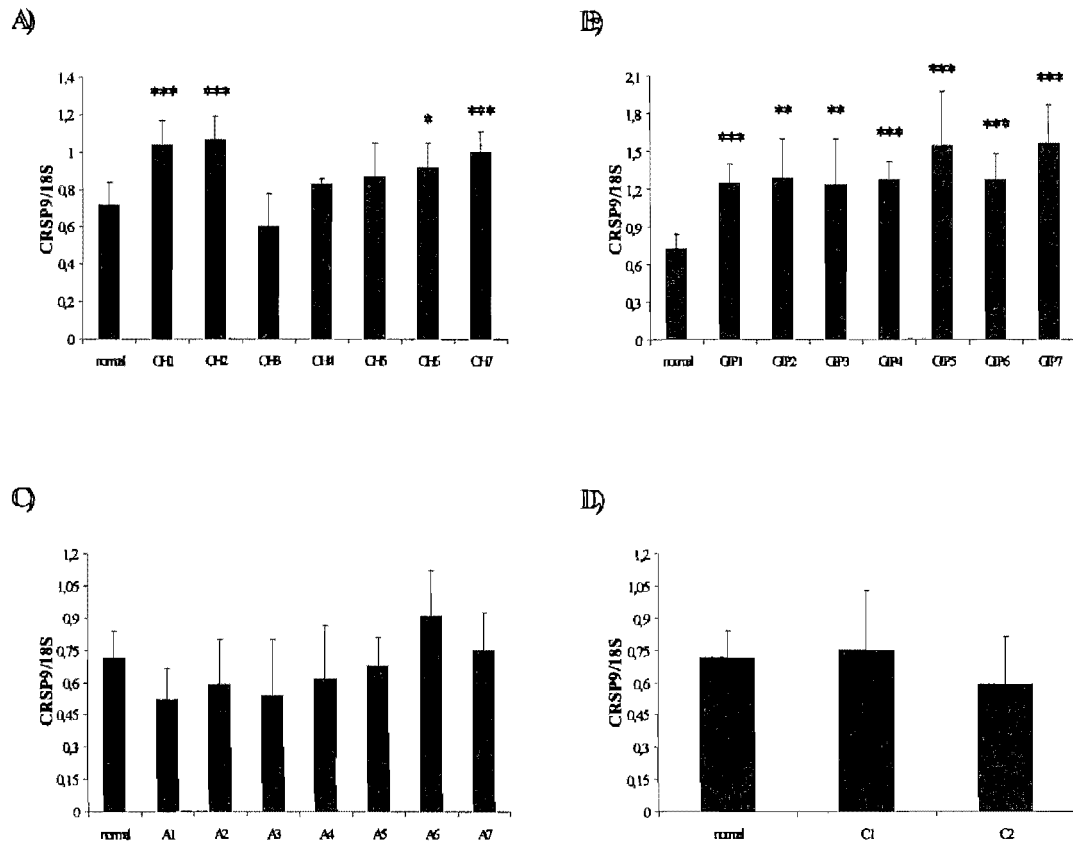


Figure 3,17. Expression de l'ARNm du facteur de transcription CRSP9 dans les tissus surrénaux humains. L'ARNm est réversement transcrit et amplifié par PCR multiplex à l'aide des amorces CRSP9 et 18S. Les résultats, exprimés sous la forme d'un ratio CRSP₃₃ (CRSP9) / 18S, représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas et leur écart type. L'analyse statistique est réalisée à l'aide du test t de Student et un p-value de $\leq 0,05$ est considéré comme significatif (* $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$ *** $\leq 0,001$) A) échantillons de tissus surrénaux provenant de patients traités pour une maladie de Cushing hypophysaire B) échantillons de tissus surrénaux provenant de patients traités pour un syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP C) échantillons de tissus surrénaux provenant de patients traités pour un adénome surrénalien non dépendant du GIP D) échantillons de tissus surrénaux provenant de patients traités pour un carcinome surrénalien.

3.3.9 Comparaison des complexes observés à l'aide d'extraits nucléaires GIPR⁺ et GIPR⁻

Bien que le niveau d'expression des facteurs de transcription qui régulent l'activité promotrice d'un gène soit un facteur important impliqué dans les mécanismes de régulation génique, d'autres événements telle que la régulation de l'affinité de liaison de ces facteurs pour l'ADN peuvent également influencer l'expression génique. Afin de déterminer si les facteurs de transcription Sp1 et

Sp3 se lie à leur site de liaison aussi bien dans les HeLa que dans les HGT-1, nous avons réalisé un essai de retardement sur gel sur la région 0/-100 pb.

Pour faciliter le travail, la région est découpée en 3 sous-régions (0/-40 ; -40/-70 et -60/-100). Chacune des sondes est ensuite incubée en présence d'extraits nucléaires HeLa ou HGT-1, puis les complexes sont résolus sur gel de polyacrylamide et exposés au PhosphorImager pour 24 h. Tel que prévu, deux complexes spécifiques contenant respectivement les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 sont observés avec les sondes -30/-70 et -60/-100 qui sont incubées en présence d'extraits nucléaires HGT-1 (Figures 3,18 et 3,19). Les deux mêmes complexes sont observés lorsque les sondes -30/-70 et -60/-100 sont incubées en présence d'extraits nucléaires HeLa, ce qui suggère que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 sont capables de lier le promoteur aussi bien dans les cellules qui expriment que dans celles qui n'expriment pas le GIPR. Cependant, la différence d'intensité des bandes observée ne nous permet pas de déterminer s'il existe ou non des différences au niveau de l'affinité de liaison. Les mêmes complexes sont également observés lorsque les deux sondes sont incubées en présence d'extraits nucléaires de cellules provenant de tissu surrénalien de patients atteints d'un syndrome de Cushing hypophysaire et de patients atteints d'un Cushing surrénalien dépendant du GIP, démontrant ainsi qu'une différence dans la composition des complexes n'est pas non plus responsable de l'expression ectopique du GIPR chez les patients avec Cushing dépendant du GIP.

Un troisième complexe de plus petite taille est également observé en présence des sondes -30/-70 et -60/-100, mais contrairement aux deux autres, ce complexe n'est que peu déplacé par l'ajout de faibles concentrations de sonde non marquée radioactivement, alors que l'ajout de la sonde non spécifique à forte concentration semble diminuer l'importance du complexe, ce qui suggère que cette bande n'est pas spécifique aux sondes -30/-70 et -60/-100 (résultats non présentés).

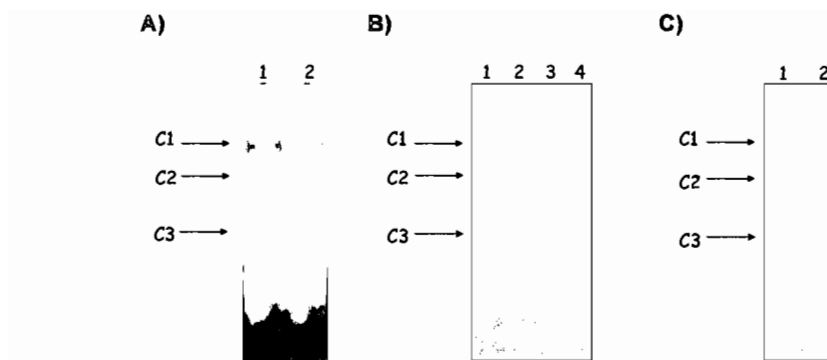


Figure 3,18. Profil de liaison des facteurs de transcription *Sp1* et *Sp3*. La sonde -30/-70 a été marquée avec du ^{32}P dCTP et incubée en présence d'extraits nucléaires isolés à partir des (A) des cellules HGT-1 (1) ou des cellules HeLa (2) de même qu'en présence d'extraits nucléaires isolés à partir (B) de cellules de tissu surrénalien prélevé chez des patients avec syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP (1) en présence de l'anticorps anti-*Sp1* (2), de l'anticorps anti-*Sp3* (3) ou du sérum pré-immun (4) ou (C) de cellules provenant de tissu surrénalien prélevé chez des patients avec une maladie de Cushing hypophysaire (1) en présence d'une sonde non spécifique (2).

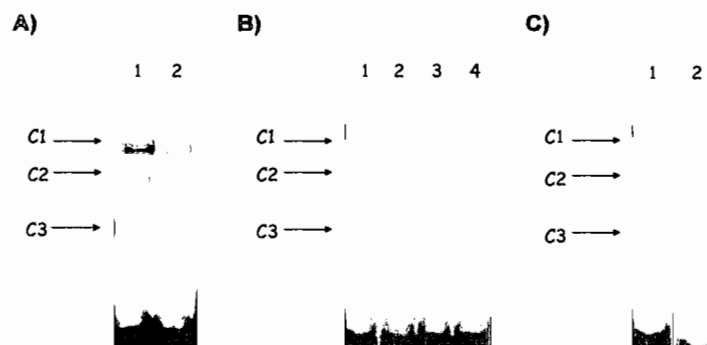


Figure 3,19. Affinité de liaison des facteurs de transcription *Sp1* et *Sp3*. La sonde -60/100 a été marquée avec du ^{32}P dCTP et incubées en présence d'extraits nucléaires isolés à partir des (A) des cellules HGT-1 (1) ou des cellules HeLa (2) de même qu'en présence d'extraits nucléaires isolés à partir (B) de cellules de tissu surrénalien prélevé chez des patients avec syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP (1) en présence de l'anticorps anti-*Sp1* (2), de l'anticorps anti-*Sp3* (3) ou du sérum pré-immun (4) ou (C) de cellules provenant de tissu surrénalien prélevé chez des patients avec une maladie de Cushing hypophysaire (1) en présence d'une sonde non spécifique (2).

Deux complexes sont aussi observés lorsque la sonde 0/-40 est incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1. Cependant, seul le complexe C2 est observé lorsque cette même sonde est incubée en présence d'extraits nucléaires de cellules HeLa (Figure 3,20 A). Cette différence de liaison est également

retrouvée dans les échantillons de tissu surrénalien qui ne présentent que la bande correspondant au complexe C2 (Figure 3,20 C). Cependant, tous les échantillons de tissu surrénalien (contrôle normaux, maladie de Cushing et Cushing surrénalien dépendant du GIP) semblent présenter le même profil de migration, ce qui suggère que ce complexe pourrait être impliqué dans l'expression cellulaire spécifique, mais pas dans l'expression ectopique du GIP-R chez les patients atteints du syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP. Cette observation est particulièrement intéressante puisque la comparaison de l'activité du promoteur dans les cellules HGT-1 et HeLa nous a montré que les cellules HeLa ne parviennent pas à induire l'expression du promoteur du hGIP-R et ce même avec la construction du promoteur basal.

Bien que le profil de migration des complexes observés avec la sonde 0/-40 soit similaire à celui observé avec les sondes -30/-70 et -60/-100, les deux complexes sont déplacés par l'ajout de sérum pré-immun (Figure 3,20 B), ce qui semble suggérer qu'ils pourraient ne pas être spécifiques. Toutefois, une compétition en présence de fortes concentrations de BSA (résultats non présentés) ne permet pas de déplacer les deux complexes. Il semble donc que la compétition observée en présence du sérum pré-immun soit due à la présence dans les complexes C1 et C2 d'une protéine présente également dans le sérum. D'autres études seront néanmoins nécessaires pour élucider complètement le contenu en protéines de ces deux complexes.

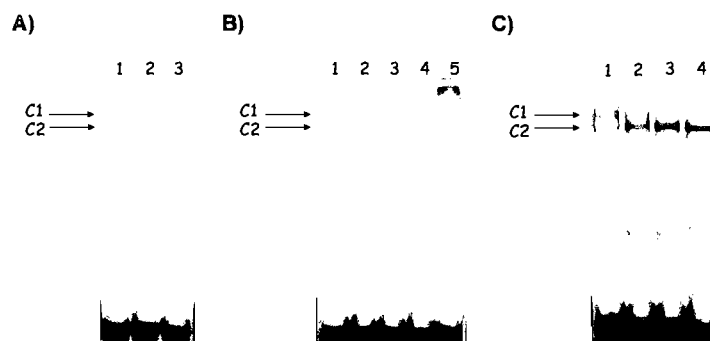


Figure 3,20. Affinité de liaison des facteurs de transcription *Sp1* et *Sp3*. La sonde 0/-40 a été marquée avec du ^{32}P dCTP et incubée en présence d'extraits nucléaires isolés à partir des cellules HGT-1, HeLa ou des cellules de tissu surrénalien. A) sonde 0/-40 incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 (1), auxquels sont ajoutés une sonde non marquée (2) ou d'extraits

nucléaires de cellules HeLa (3). B) sonde 0/-40 incubée en présence d'extraits nucléaires HGT-1 (1), en présence d'une sonde non marquée (2) d'un anticorps anti-Sp3 (3), d'une sonde non spécifique (4) et du sérum pré-immun. C) sonde 0/-40 incubée en présence d'extraits nucléaires de cellules HGT-1 (1), d'extraits nucléaires de tissu surrénalien provenant d'un patient avec syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP (2) avec maladie de Cushing (3) et de cellules de tissu surrénalien d'un contrôle sain.

3.3.10 Analyse de la séquence nucléotidique du facteur de transcription Sp3
En plus de contrôler le niveau d'expression des facteurs de transcription et d'influencer leur degré d'affinité pour l'ADN, la cellule peut modifier l'activité de certains facteurs de transcription ou de leurs co-facteurs. Par exemple, certaines protéines peuvent agir à la fois comme activateur et comme répresseur selon le contexte cellulaire. La plupart du temps, l'activité de ces protéines est régulée grâce à la phosphorylation, la glycosylation ou l'acétylation de résidus acides aminés du domaine activateur ou répresseur qui sont importants pour son activité.

Le facteur de transcription Sp3 est un exemple de facteur de transcription qui peut agir à la fois comme activateur et comme répresseur. Bien que les mécanismes par lesquels l'activité de Sp3 est régulée ne soient pas encore tous élucidés, de plus en plus d'études montrent que l'acétylation d'un résidu lysine spécifique à l'intérieur du domaine d'activation serait nécessaire et suffisante pour inhiber l'activité activatrice de Sp3 et le transformer en répresseur.

Aucune étude n'est parvenue à démontrer pourquoi Sp3 agit comme répresseur pour l'activité de certains gènes et pourquoi il agit comme activateur dans d'autres promoteurs. Cependant, il semble que dans les promoteurs qui contiennent de nombreux sites de liaison pour Sp1/Sp3, Sp3 a tendance à inhiber la transcription, alors que dans les promoteurs qui contiennent un site unique, il aurait plutôt un effet activateur.

Le promoteur du hGIP-R contient de nombreux sites Sp1/Sp3, ce qui suggère que, dans ce contexte, le rôle de Sp3 pourrait être d'inhiber la transcription. Les

résultats que nous avons obtenus lors des essais de transfection semblent d'ailleurs aller dans ce sens, puisque, contrairement à ce qu'on pourrait attendre, la mutation de certains sites active la transcription plutôt que de l'inhiber. Une mutation du triplet de nucléotides codant pour la lysine empêcherait donc l'acétylation du domaine d'activation de Sp3 et provoquerait une activation incontrôlée des gènes qui sont normalement réprimés par ce facteur.

Afin de déterminer si une mutation de ce codon est observée chez nos patients traités pour un syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP, nous avons séquencé l'ADN provenant des cellules de tissu surrénalien chez 2 patients atteints d'une maladie de Cushing hypophysaire, 4 patients avec syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP et 2 contrôles sains, sur une région comprise entre -250 pb en amont et -250 pb en aval du codon lysine. Aucune mutation n'a cependant été observée ni pour les patients, ni pour les contrôles sains dans cette région.

consensus	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
NA ₁	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
NA ₂	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
CH ₁	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
CH ₂	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
GIP ₁	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
GIP ₂	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
GIP ₃	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc
GIP ₄	ctgcagatattaggatcaaggaagaagaacctgatcc

Figure 3,21. Séquençage d'une région de 500 pb dans la région codante du facteur de transcription Sp3. Les nucléotides en rouge forme le triplet codant pour la lysine acétylée.

3.4 Éléments distaux

Bien que nos recherches aient surtout porté sur la région proximale (0/-350) du promoteur du hGIPR, nous avons également effectué quelques études préliminaires sur la région distale. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont présentés dans cette section.

3.4.1 Région inhibitrice

La transfection des fragments du promoteur du hGIP-R jusqu'à -2 kb nous a permis d'identifier une région (GIPR-473) qui inhibe l'activité du gène rapporteur luciférase, même dans les HGT-1 qui expriment le GIPR.

Afin de mieux caractériser cette région, nous avons amplifié des fragments de délétion (≈ 30 bp) du promoteur dont la taille variait entre -336 bp et -595 bp (GIPR-336 ; GIPR-360 ; GIPR-390 ; GIPR-422 ; GIPR-473 ; GIPR-500 ; GIPR-550 ; GIPR-595) (Figure 3,22). La transfection de ces fragments dans les HGT-1 a permis de déterminer qu'entre -336 bp et -390 bp, l'activité luciférase augmente jusqu'à atteindre sept fois l'activité du vecteur contrôle, ce qui signifie que l'effet inhibiteur observé lors des premiers essais de transfection n'est pas localisé dans cette région. L'ajout de nucléotides jusqu'à -422 bp diminue l'activité luciférase de deux fois par rapport au vecteur contrôle, ce qui est beaucoup moindre que ce qui est observé avec la construction GIPR-390. Les nucléotides situés entre -390 bp et -422 bp ont donc probablement un rôle important à jouer dans l'effet inhibiteur observé. Toutefois, l'activité inhibitrice n'est optimale qu'avec la construction GIPR-473 (même niveau que le contrôle), ce qui indique que les nucléotides situés entre -422 bp et 473 bp sont, du moins en partie, également importants. Enfin, l'ajout des nucléotides jusqu'à -500 bp entraîne une augmentation de l'activité luciférase à un niveau similaire à celui observé avec la construction GIPR-390, ce qui suggère que les nucléotides situés entre -473 bp et -500 bp permettent de contrecarrer l'effet de la région inhibitrice. La transfection des constructions GIPR-550 et GIPR-595 maintient l'activité luciférase à ce niveau.

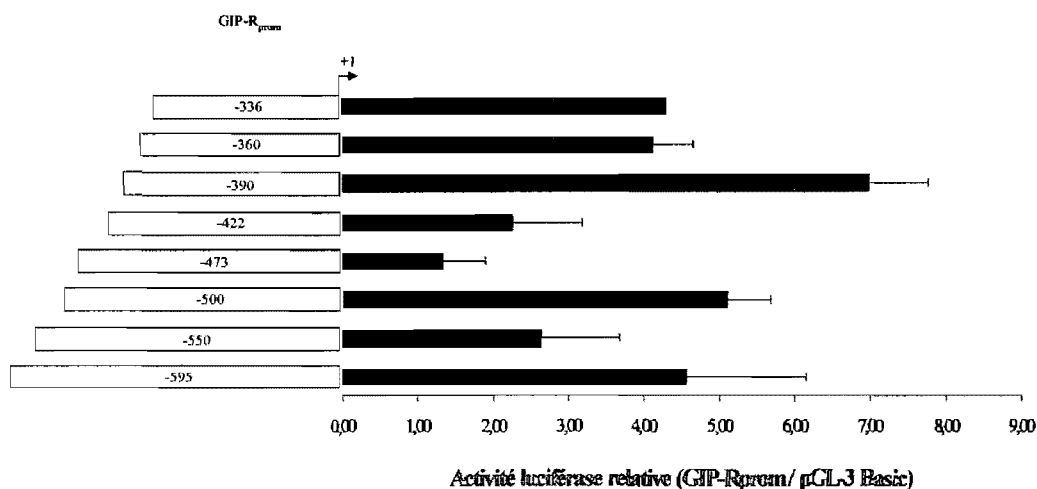


Figure 3.22 Analyse fonctionnelle de la région inhibitrice du promoteur du gène codant pour le hGIPR. Les fragments du promoteur du hGIPR sont co-transfectés de manière transitoire avec un vecteur RSV β -gal. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas avec leur écart type et sont rapportés en fonction de leur activité par rapport à l'activité du vecteur contrôle gwpGL-3 Basic.

Afin de déterminer si la région inhibitrice agit négativement de manière directe sur l'activité du promoteur par l'intermédiaire d'un répresseur, ou si l'effet observé implique un mécanisme de régulation plus complexe, nous avons inséré le fragment -390/-473 dans le vecteur pGL-3 promoteur en amont du promoteur SV-40. Le promoteur SV-40 est un promoteur fort qui induit l'activation constitutive du gène rapporteur luciférase, alors que les répresseurs sont des facteurs de transcription qui possèdent une activité inhibitrice intrinsèque. Ainsi, la liaison d'un répresseur à un promoteur est suffisante pour inhiber l'expression du gène rapporteur luciférase, même en présence du promoteur SV-40.

Les résultats obtenus montrent que l'activité du promoteur SV-40 n'est pas affectée par l'insertion du fragment -390/-473, ce qui indique que cette région ne lie pas un répresseur.

Une étude de retardement sur gel réalisée à l'aide des fragments -381/-422 et -422/-473 montre que trois complexes spécifiques se lient à ces deux régions du promoteur. De plus, ces trois complexes sont observés aussi bien en présence

d'extraits nucléaires préparés à partir de cellules HeLa que de HGT-1 (Figure 3,23).

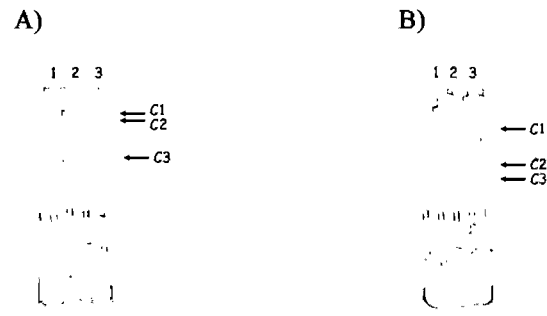


Figure 3,23. Formation de complexes spécifiques entre la région inhibitrice du promoteur du hGIPR et les extraits nucléaires de cellules HeLa et HGT-1. Les sondes -390/-422 (A) et -422/-473 (B) ont été marquées avec du ^{32}P dCTP et incubées en présence d'extraits nucléaires isolés à partir de HGT-1 ou de HeLa, puis migrées sur gel de polyacrylamide. (1) : sonde ; (2) : extraits nucléaires HGT-1 ; (3) : extraits nucléaires de HeLa. A) sonde -390/-422 B) -422/-473.

L'identité de ces complexes n'est pas encore connue, mais une analyse de la région a permis de montrer que trois éléments de réponse potentiels se trouvaient dans cette région du promoteur (Figure 3,24). Trois de ces sites sont des consensus pour le facteur de transcription Smad3 et le facteur de transcription TGIF/MEIS2, alors qu'un de ces sites est un consensus pour un facteur de transcription encore inconnu, NP-III.



Figure 3,24. Analyse de la région du promoteur du hGIPR située entre -381 pb et -500 pb.

L'analyse de la région promotrice distale du hGIP-R a permis d'identifier deux éléments de réponse négative au calcium (nCaRE) situés à -5 kb en amont du site d'initiation de la transcription (Figure 3,25).

-5 848

-5 541

-5 363

-5 218

Les deux éléments nCaRE identifiés dans le promoteur du hGIPR sont précédés d'une séquence de 25 T importante pour l'activité des éléments nCaRE précédemment répertoriés. De plus, ils présentent une forte homologie de séquence avec le consensus identifié pour la première fois dans le promoteur de la PTH (Figure 3,26).

...TTTTTGAGACAGGGTCTCA	PTH
...TTTTTGAGACAGAGTC TG	hGIP-R (nCaRE1)
...TTTTTGAGACAGGGTCTCA	PTH
...TTTTTGAGACAGGATCTCA	hGIP-R (nCaRE2)

Figure 3,26. *Comparaison de la séquence nucléotidique des éléments nCaRE hGIPR avec la séquence consensus nCaRE PTH.*

Trois constructions contenant l'élément nCaRE 1 (5'), l'élément nCaRE 2 (3') ou les éléments nCaRE 1 et 2 clonés en amont d'un promoteur fort SV-40 ont été transfectées dans les HeLa, une lignée cellulaire capable de répondre à une variation du niveau de calcium extracellulaire. Une construction contenant le nCaRE PTH a également été transfectée comme contrôle. Les cellules transfectées ont ensuite été incubées en présence de 0,3 mM ou 3 mM CaCl₂ pendant 40 h. Les résultats obtenus montrent que l'activité luciférase est fortement inhibée à hautes concentrations en calcium (3 mM). Toutefois, la construction qui contient les deux éléments nCaRE ne semble pas inhiber l'activité luciférase plus fortement que les deux constructions qui contiennent un seul élément. Ces observations suggèrent que les éléments nCaRE présents dans le promoteur du hGIP-R sont fonctionnels et capables de répondre au calcium, du moins in vitro, mais que leur effet n'est pas synergique (Figure 3,27).

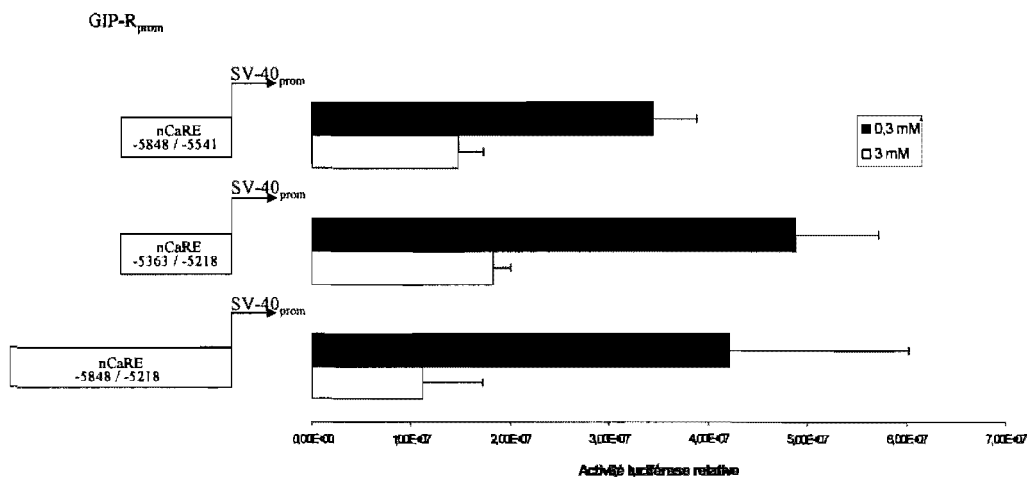


Figure 3.27. Analyse fonctionnelle des éléments de réponse nCaRE identifiés dans le promoteur du hGIPR. Les fragments du promoteur du hGIPR sont co-transfectés de manière transitoire avec un vecteur RSV β -gal. Les résultats représentent la moyenne de trois essais indépendants réalisés en duplicatas avec leur écart type.

Une étude de retardement sur gel a également permis de démontrer que les deux éléments nCaRE sont capables de lier trois complexes protéiques à 3 mM CaCl_2 , alors que seulement deux complexes sont observés à 0,3 mM, tel que précédemment publié pour le nCaRE PTH.

Le niveau d'expression du GIPR dans les HeLa en présence de 0,3 mM et de 3 mM CaCl_2 a aussi été déterminé par PCR multiplex à l'aide d'amorces spécifiques pour le GIPR et le 18S (Figure 3,28). Cependant, le GIPR n'est pas ou très peu exprimé dans les HeLa. Les résultats obtenus ne permettent donc que de montrer que de faibles concentrations en calcium ne peuvent restituer l'expression du GIP-R dans ces cellules. Afin de déterminer l'effet réel d'une variation de calcium sur l'expression du GIP-R, il faudrait refaire cette expérience avec une lignée cellulaire qui exprime le GIP-R. Toutefois, cette étude est limitée par la difficulté d'obtenir une lignée cellulaire qui exprime suffisamment le GIP-R tout en répondant à une variation du niveau de calcium extracellulaire.

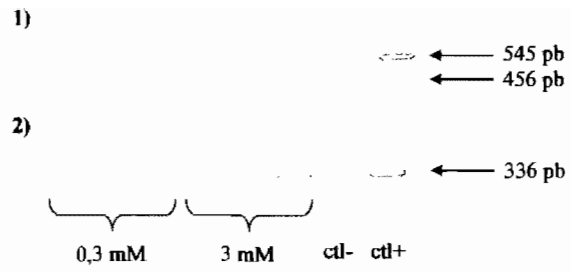


Figure 3.28. Expression de l'ARNm du GIPR dans les HeLa en présence de 0,3 mM ou de 3 mM CaCl_2 . L'ARNm est réversement transcrit à l'aide de la M-MLV-RT et amplifié par PCR multiplex à l'aide des amorces GIPR et 18S. L'expérience a été réalisée en duplicat lors de trois essais indépendants.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

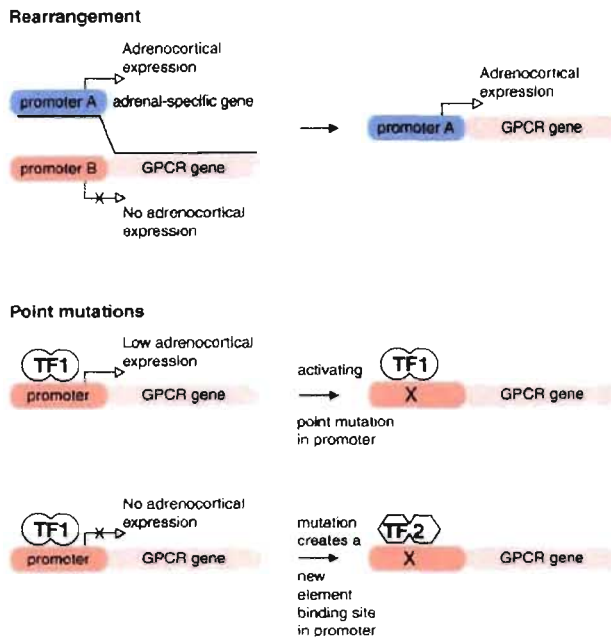


4. Discussion

Le syndrome de Cushing résulte de l'exposition prolongée des tissus à des concentrations anormalement élevées de cortisol. Il peut être dû à une augmentation du niveau d'ACTH circulant (syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH) ou résulter d'une production excessive de cortisol en absence d'ACTH (syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH). Depuis quelques années, plusieurs équipes de chercheurs, dont la nôtre, ont mis en évidence la présence de récepteurs hormonaux aberrants, incluant le GIPR, dans la corticosurrénale hyperplasique ou dans les adénomes corticosurrénaliens des patients atteints du syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH.

Le syndrome de Cushing dépendant du GIP résulte de l'expression ectopique du GIPR non muté dans l'adénome unilatéral ou l'hyperplasie macronodulaire bilatérale du patient. Bien que les mécanismes responsables de l'expression ectopique du GIPR dans les cellules corticosurrénaliennes de ces patients ne soient pas encore connus, les nombreuses données publiées dans la littérature sur les cas d'expression aberrante de protéines permettent de formuler certaines hypothèses. L'expression ectopique d'une protéine peut s'expliquer par une translocation chromosomique, anomalie qui n'a cependant pas été décrite jusqu'à présent dans la surrénale des patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Les polymorphismes de l'ADN, de même que les mutations spontanées, qui sont situés dans la région promotrice des gènes représentent également une explication possible à l'expression aberrante de certaines protéines (Figure 4,1).

A. Mutations in cis



B. Mutations in trans

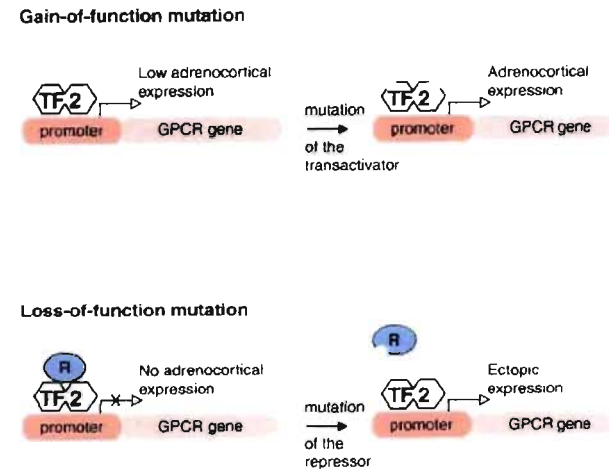


Figure 4.1. Rôles des anomalies génétiques dans l'expression ectopique du GIPR.

Bien qu'un polymorphisme ou une mutation spontanée du promoteur puisse être impliqué dans l'expression aberrante d'un récepteur unique, la mutation simultanée dans le promoteur de plusieurs gènes différents est peu probable. Dans cette dernière situation, il est possible que la mutation ou l'altération de l'activité d'un facteur de transcription commun soit responsable. Cette anomalie génétique pourrait également expliquer certains cas de récepteurs aberrants uniques si le facteur impliqué joue un rôle spécifique dans l'expression de ce récepteur.

4.1 Analyse de la séquence nucléotidique du promoteur du hGIPR

À ce jour, l'expression ectopique du GIPR a été rapportée chez plus de trente patients. Afin de déterminer si une mutation du promoteur pourrait expliquer son expression ectopique dans la surrénale humaine, le séquençage de cette région a été réalisé à partir de l'ADN provenant de cellules

corticosurréaliennes de neuf de ces patients ainsi que de leur ADN leucocytaire.

Au total, onze polymorphismes ont été identifiés dans le promoteur du hGIPR. Toutefois, ces mêmes polymorphismes ont également été observés chez les contrôles sains, ce qui semble indiquer qu'ils ne sont que des variations nucléotidiques sans impact sur la transcription du GIPR. Une analyse des régions touchées par ces polymorphismes a permis de constater qu'aucun site de liaison potentiel n'est affecté par ces variations, ce qui suggère qu'aucun lien n'existe entre les polymorphismes présents dans le promoteur du GIPR et l'expression ectopique de ce récepteur chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Bien que cette étude n'ait pas porté sur tous les cas d'expression ectopique du GIPR, les résultats obtenus semblent suggérer qu'aucun polymorphisme du promoteur du GIPR n'explique l'expression ectopique du GIPR chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Cependant, il n'est pas exclu qu'un des patients dont l'ADN n'a pas été séquencé puisse présenter une mutation spontanée dans cette région. Puisque nous avons maintenant montré que certaines régions du promoteur sont importantes pour la régulation de l'expression du GIPR, il sera intéressant de procéder au séquençage de ces régions chez d'autres patients afin d'approfondir les résultats de cette étude.

Par ailleurs, la méthylation de l'ADN peut jouer un rôle important dans la régulation de l'activité promotrice d'un gène. La région promotrice proximale du GIPR est fortement pourvue en nucléotides G et C (plus de 60 %) et comporte de nombreux dinucléotides CG, qui représentent des sites de méthylation potentiels. Bien que la méthylation de cette région d'ADN n'ait pas été étudiée en profondeur, de nombreuses évidences portent à croire que son rôle dans la régulation de l'expression du GIPR n'est pas primordial. Dans le promoteur du GIPR, la région riche en G et C semble trop courte pour

correspondre à la définition d'un îlot CpG (environ 150 pb). De plus, des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ne semblent pas indiquer la présence de méthylation dans cette région. Plusieurs études ont également démontré que seuls les dinucléotides CG situés en périphérie de l'élément de réponse Sp1 sont capables de modifier l'affinité de ce facteur pour l'ADN, la méthylation du CG central (GGGCGG) n'ayant aucun effet. Or, à l'exception du site le plus en 5', aucun des sites de liaison ne présente de CG à proximité (Figure 4,2).

```

GCTTGTGAGGTTCTGTGACTGTGCCTTCCATGGCTCAGCCTATGGGATTGTGTGTGACAC

TGCATGTTTGATTGAGTGACTGAGGCTCTGGGAATGAGTGGCGGTGGGGCGGTACCT
                                     Sp1/Sp3

GTGGGTGGGACAGCATGAGAGATTGTACACACTTGGTGCAGGGTCCTCAGGACGATAA
    Sp1/Sp3

GGACAATTCAGTAACTGCCCTCCCTCATGACCTTGATGACTGCCCCCTGCTCGGCTCTCTG
                Sp1/Sp3

CCCCAGAGCTCCCCTTCCCTTCCCTGTCCCGCCTTGGCCCCCGCCCCCTCCCATCACCC
                Sp1/Sp3          Sp1/Sp3

CGGGCTGCCAGCGCCTGTCACTCTCCAGAGCCGAGACAAGGCAGTGGAggcagcggtggc
                                     +1

aggggctgcaggagcaagtgaccaggagcaggactggggacaggtgagggtccccaatcc

```

Figure 4,2. Région proximale promotrice du GIPR.

Bien que la région proximale du GIPR soit d'un intérêt limité au niveau du processus de méthylation de l'ADN, des études récentes montrent que le promoteur n'est pas la seule séquence d'ADN potentiellement méthylée susceptible de modifier la transcription d'un gène. Egr-2 est un gène suppresseur de tumeurs. L'intron 1 de ce gène contient un îlot CpG et la

méthylation de cette région stimule l'expression du Egr-2, ce qui indique que non seulement la méthylation des introns peut jouer un rôle dans le contrôle de l'expression génique, mais que son effet n'est pas que répresseur (Unoki M et Nakamura Y, 2003). Le GIPR possède également un intron 1 riche en nucléotide G et C et l'étude de cette région pourrait apporter de nouvelles données sur les mécanismes qui régulent son expression. L'induction de la méthylation / déméthylation (5-aza-2'-deoxycytidine) de l'ADN dans les cellules HeLa et HGT-1 procurerait une méthode, bien qu'indirecte, pour mettre en évidence le rôle de la méthylation dans le contrôle de la transcription du GIPR. Il serait également intéressant de comparer le niveau de méthylation de cette région dans les HeLa et les HGT-1. Pour ce faire, une première approche pourrait consister à digérer l'ADN à l'aide d'enzymes spécifiques pour les dinucléotides CG non méthylés (Figure 4,3). En cas de réponse positive, l'étude serait ensuite étendue à l'ADN des patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

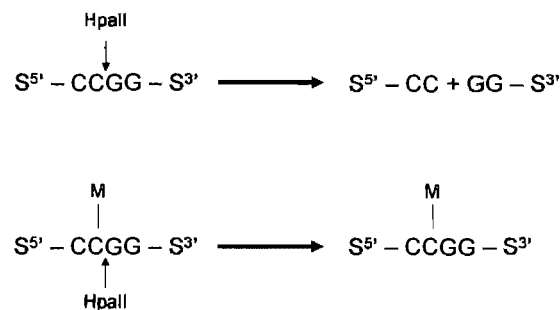


Figure 4,3. Digestion par la HpaII.

4.2 Distribution tissulaire du GIP-R

Chez le rat, la présence de l'ARNm du GIPR a été décrite depuis plusieurs années déjà (Usdin et al., 1993). Cependant, peu d'études avaient été réalisées chez l'humain.

Le GIP est principalement responsable de la régulation de la relâche de l'insuline par les cellules β du pancréas. La présence du GIPR dans ce tissu a d'ailleurs été maintes fois documentée (Volz et al., 1995 et Yamada et al., 1995). L'ARNm du GIPR a aussi été observé dans le cerveau (Chabre et al., 1998), résultat confirmé par notre étude qui montre la présence du messager du GIPR dans la plupart des régions du cerveau. Une étude a aussi montré que chez le rat, des sites de liaison pour le GIP sont présents dans les aires corticales du télencéphale (Kaplan AM et Vigna SR, 1994). Le rôle du GIPR dans le cerveau est mal compris, puisque le GIP est trop volumineux pour traverser la barrière hématoencéphalique (Takeda et al., 1987). Une étude récente suggère cependant que le GIP puisse être synthétisé dans certaines régions du cerveau, et jouer un rôle dans la neurogenèse. Les souris GIPR^{-/-} ont d'ailleurs un nombre de cellules inférieur en périphérie de l'hippocampe (Nyberg et al., 2005).

Contrairement à ce qui est observé chez le rat, le GIPR n'est pas fonctionnellement couplé à la production de cortisol dans la surrénale normale adulte et fœtale chez l'humain (Lacroix et al., 1992). Toutefois, la présence de l'ARNm du GIPR est faiblement détectée par RT-PCR dans la surrénale. Jusqu'à présent, le faible niveau d'expression du GIPR dans ce tissu était attribué à sa présence dans les cellules endothéliales (Zhong et al., 2000). Bien que ce soit toujours le cas, notre laboratoire a récemment démontré par immunohistochimie que le GIPR est exprimé faiblement dans la zone glomérulée, mais pas dans la zone fasciculée (Lampron et al., 2006a). Chez les contrôles sains, une augmentation significative du niveau d'aldostérone est d'ailleurs observée suite à une stimulation avec des concentrations physiologiques de GIP (Lampron et al., 2007).

Dans le cortex surrénalien, les cellules souches migrent de la zone glomérulée vers la zone fasciculée. Lors de leur migration, les cellules corticales modifient leur expression génique de manière à exprimer les enzymes impliquées dans la synthèse du cortisol plutôt que celles impliquées dans la synthèse de

l'aldostérone. Il semble probable que durant cette différenciation l'expression du GIPR est également perdue. Il resterait cependant présent dans les AIMAH et redeviendrait exprimé dans certains adénomes unilatéraux, ce qui suggère que la perte d'activité d'un répresseur soit responsable de l'expression ectopique du GIPR dans la zone fasciculée. La comparaison des gènes exprimés dans la zone glomérulée et dans la zone fasciculée pourrait contribuer à l'identification de ce facteur.

Dans un récent article, Sword rapporte la surexpression du GIPR dans la surrénale de cinq patients atteints d'une maladie de Cushing et d'un patient avec PPNAD, suggérant ainsi qu'une stimulation chronique par l'ACTH ou une activation constitutive de la voie de signalisation régulée par le récepteur pourrait moduler l'expression du GIPR (Sword 2005). Nos études ne confirment toutefois pas cette hypothèse, puisque nous n'avons pas observé la présence de l'ARNm du GIPR dans la surrénale de sept patients atteints de la maladie de Cushing, ni chez sept patients avec un adénome unilatéral. Ces résultats sont d'ailleurs en accord avec l'absence du GIPR dans le tissu surrénalien d'un patient souffrant d'une maladie de Cushing (N'Diaye et al., 1998) et de deux patients atteints d'un syndrome de Cushing avec sécrétion ectopique d'ACTH (Chabre 1998). De plus, une étude d'immunohistochimie réalisée plus récemment dans notre laboratoire (Lampron et al., 2006a) a démontré l'absence du récepteur dans les cellules de la zone fasciculée de surrénales normales ou dans les lésions sécrétant du cortisol de façon non dépendante du GIP (maladie de Cushing, adénomes, hyperaldostéronisme) et sa présence dans les tissus surrénaliens dépendant du GIP, confirmant les résultats obtenus jusqu'à présent.

Bien que les mécanismes impliqués dans l'expression ectopique du GIPR dans les cellules de la zone fasciculée ne soient pas encore élucidés, une étude réalisée chez la souris a permis de démontrer que l'expression ectopique du GIPR n'est pas une conséquence, mais bien une cause impliquée dans le développement de l'hyperplasie ou de l'adénome corticosurrénalien (Mazzucato

et al., 2005). Une étude similaire a également été réalisée avec le récepteur à la LH et a conduit à des conclusions identiques (Mazzuco et al., 2005).

Une étude réalisée avec des rats diabétiques semble suggérer que le syndrome de Cushing n'est pas la seule pathologie où une expression aberrante du GIP-R pourrait être impliquée (Cho et al., 2002). Les auteurs de cette étude tentaient d'élucider les mécanismes qui induisent l'apparition de la rétinopathie, une maladie de la rétine fréquemment observée chez les patients diabétiques. Leurs recherches ont conduit à l'identification de l'expression rétinienne de nombreux gènes, dont ceux qui codent pour le GIP et son récepteur. L'implication de cette observation n'est pas encore clairement définie. Cependant, nous savons que la rétinopathie est une affection de la rétine causée par la prolifération de néovascularisations capillaires et que le GIP module le flux sanguin dans les vaisseaux chez le chien (Svensson et al., 1997 et Kogire et al., 1998). Il est donc légitime de penser qu'à un stade précoce, l'augmentation de l'expression du GIP et de son récepteur dans la rétine pourrait contribuer, avec les mécanismes reliés à l'hyperglycémie, à la prolifération anormale des vaisseaux sanguins qui conduit aux premiers symptômes de rétinopathie chez les patients. Par ailleurs, les résultats de cette étude montrent pour la première fois la présence du messenger du GIP dans un tissu autre que le petit intestin et les glandes salivaires (Tseng et al., 1995), ce qui ouvre la voie à la possibilité que le GIP puisse être exprimé, bien que faiblement, dans certains tissus et ainsi contribuer à son action. Les données recueillies lors de cette étude procurent non seulement des informations nouvelles pour la compréhension du développement de la rétinopathie chez les patients diabétiques, mais également un second modèle potentiellement intéressant pour l'étude des mécanismes de régulation de l'expression du GIP-R.

Les résultats que nous avons obtenus dans cette étude ont montré la présence de l'ARNm du GIPR dans la trachée et, à un niveau moindre, dans le cœur, le système digestif, la rate, le thymus, les poumons, les reins, la glande thyroïde,

les glandes salivaires, la prostate, la vessie et les cellules sanguines. La présence du GIPR dans tous ces tissus suggère que le GIP, par l'intermédiaire de son récepteur, puisse jouer un rôle beaucoup plus large que la simple relâche de l'insuline par les cellules β du pancréas dont l'absorption des nutriments par les cellules, hypothèse confirmée par la découverte d'un rôle direct pour le GIP dans les cellules adipeuses (Eckel et al., 1979 ; Ebert R et Nauck MA, 1991 ; Oben J et al., 1991 ; Morgan LM, 1996), hépatique (Hartmann et al., 1986), musculaires (O'Harte et al., 1998) et osseuse, de même que par les études sur les souris GIPR^{-/-}. Bien que chez l'homme le GIP ne stimule la sécrétion d'acide gastrique qu'à une concentration supraphysiologique (Maxwell et al., 1980 ; Nauck MA et al., 1992) cet effet suggère la présence d'un récepteur fonctionnel dans ce tissu.

Si le GIP contribue à l'absorption des nutriments par les cellules, il reste encore à déterminer pourquoi le GIPR ne semble pas présent dans certains tissus comme le muscle squelettique, le foie, l'œsophage, le placenta, l'utérus et les testicules. Toutefois, l'absence de signal pour la surrénale alors qu'un très faible niveau d'ARNm est observé par RT-PCR (N'Diaye et al., 1998) et que la protéine est présente dans la zone glomérulée (Lampron et al., 2006a ; Lampron et al., 2007) laisse croire que le GIPR pourrait également être exprimé à un faible niveau dans certaines cellules de ces tissus.

Cette étude a aussi permis de détecter le message du GIPR dans les tissus fœtaux de cœur, de poumons et de reins, trois tissus qui expriment le GIPR à l'âge adulte. Toutefois, le GIPR n'est pas présent dans le cerveau, la rate et le thymus, qui expriment le GIPR à l'âge adulte, ni dans le foie, qui n'exprime cependant pas ce récepteur à l'âge adulte. Comme pour la distribution tissulaire du GIPR chez l'adulte, les raisons qui peuvent expliquer les différences d'expression chez le fœtus et l'adulte demeurent encore à élucider.

La détection du messenger du GIPR dans la plupart des tissus procure un indice important quant à un rôle biologique autre que celui d'abord décrit. Malheureusement, l'absence d'anticorps anti-GIPR capable de reconnaître le récepteur de manière spécifique en immunobuvardage de Western ne nous a pas permis de vérifier la présence d'une protéine fonctionnelle à la surface des cellules dans ces tissus. Dans l'attente d'un anticorps spécifique en immunobuvardage de Western, il serait possible de stimuler les cellules de certains tissus cibles avec le GIP et d'observer l'élévation du niveau d'AMPc dans la cellule puisque l'AMPc est le principal second messenger à être produit suite à la stimulation du GIPR. Cette approche requiert néanmoins la disponibilité de tissus frais et le maintien en culture de leurs cellules.

4.3 Analyse de la région proximale du hGIPR

Les résultats obtenus lors du séquençage du promoteur du hGIPR suggèrent que des anomalies au niveau d'un facteur de transcription ou d'un co-facteur puissent être responsables de l'expression ectopique du GIPR dans la corticosurrénale des patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Cette hypothèse permettrait non seulement d'expliquer les cas d'expression anormale d'un seul récepteur, mais également les cas, de plus en plus nombreux, où la présence de plus d'un récepteur est observée. Une anomalie d'un facteur de transcription commun à la régulation de l'expression de ces récepteurs pourrait entraîner l'expression anormale de plusieurs récepteurs simultanément.

L'identification d'une anomalie dans un facteur de transcription requiert la connaissance des facteurs de transcription capables de lier la région promotrice des gènes codant pour les récepteurs hormonaux. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression du hGIPR.

L'analyse de la région proximale du promoteur du hGIPR nous a révélé une séquence riche en nucléotides G et C et dépourvue de boîte TATA telle que

décrite pour les autres membres de la famille glucagon / VIP / sécrétine (Buggy et al. 1995 ; Lankat-Buttgereit et al. 1997 ; McCuaig et al. 1995 ; Sreedharan et al., 1995 ; Wildhage et al. 1999), ainsi que pour le GIPR chez le rat (Boylan et al. 1999).

Six boîtes GC / CACCC fonctionnelles (GC-48/-53 ; GC-65/-70 ; GC-77/-82 ; GT-150/-156 ; GT-223/-229 et GC-237/-242) dont cinq capables de lier les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (GC-65/-70 ; GC-77/-82 ; GT-150/-156 ; GT-223/-229 et GC-237/-242) ont été identifiées dans le promoteur proximal du GIPR.

Bien que cinq des six sites lient les mêmes facteurs de transcription *in vitro*, le rôle et l'importance de chacun de ces sites ne semblent pas être identiques. Les deux boîtes GC localisées près du site d'initiation de la transcription (GC-48/-53 ; GC-65/-70) semblent essentielles à l'expression du hGIPR, puisque leur mutation entraîne l'abolition de l'activité du promoteur. Toutefois, la mutation des quatre autres boîtes GC / CACCC entraîne plutôt une augmentation de l'activité luciférase, ce qui suggère que ces sites agissent comme répresseur de la transcription.

Ce phénomène a déjà été observé et décrit lors de l'étude du promoteur du récepteur du GLP-1 (Wildhage et al., 1999). Cette étude montrait que l'effet observé était dû à la liaison de Sp3, un facteur de transcription qui peut agir soit comme activateur ou comme répresseur selon le contexte. Les raisons qui expliquent que l'activité de Sp3 diffère selon le promoteur auquel il se lie ne sont pas encore claires. Cependant, les données publiées jusqu'à maintenant suggèrent que Sp3 active la transcription dans les promoteurs qui contiennent un site unique tel que celui de la thymidine kinase et réprime l'activité dans les promoteurs qui possèdent des sites multiples tels que celui de la dihydrofolate réductase. Dans cet ordre d'idée, le promoteur du GIP-R qui contient au moins cinq sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 / Sp3 pourrait bien

permettre à Sp3 d'exercer son effet répresseur sur la transcription, ce qui expliquerait également les résultats obtenus lors des essais transfection avec les mutants. Par ailleurs, il est possible que même si Sp1 et Sp3 sont capables de lier les cinq boîtes GC / CACCC avec une forte affinité *in vitro*, l'affinité de chacun des sites pour ces facteurs diffère *in vivo*. Dans ce cas, le rapport Sp1 / Sp3 dans la cellule, de même que la régulation de l'activité de Sp3, pourraient être d'une importance capitale sur le niveau d'expression du récepteur. Les essais de retardement sur gel réalisés dans cette étude ont permis de démontrer la capacité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 à lier l'ADN. Cependant, l'affinité de ces facteurs pour chacune des séquences consensus devrait être étudiée plus amplement puisque l'intensité plus faible de certains complexes aussi bien avec les extraits nucléaires purifiés à partir des lignées cellulaires qu'à partir des échantillons de tissu surrénalien suggère que l'affinité de liaison puisse varier. De même, l'observation d'une affinité accrue de Sp1 pour son élément de réponse dans les tumeurs épithéliales indique que la capacité de liaison de ce facteur puisse jouer un rôle dans la croissance incontrôlée des cellules. La mithramycine, un inhibiteur de la liaison de Sp1 à l'ADN, pourrait être utilisée afin de démontrer l'effet d'une baisse de la liaison de Sp1 sur l'expression du GIPR. Il est également possible *qu'in vivo*, la liaison d'un facteur à un des sites modifie l'affinité de liaison à certains des autres sites.

Les études de liaison *in vitro* permettent de déterminer le profil de liaison d'une protéine à une séquence d'ADN. Cependant, *in vivo*, les promoteurs sont des séquences contenant des éléments de réponse pour de nombreuses protéines et l'activation ou l'inhibition de la transcription d'un gène requiert la liaison d'une combinaison de facteurs qui peuvent se lier de manière coopérative, agir en synergie ou encore être en compétition. Puisque les boîtes GC/CACCC lient la plupart des membres de la famille Sp/KLF, dont certains sont activateurs et d'autres répresseurs, il est possible qu'*in vivo*, la liaison d'une autre protéine Sp/KLF puisse expliquer l'effet observé en transfection. C'est le cas notamment du facteur BTEB1, qui agit comme répresseur, et qui semble sous-exprimé dans

la surrénale de certains patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP (Bourdeau et al., 2004). Avant d'aller plus loin, il serait cependant nécessaire de déterminer si cette baisse d'expression est spécifique à ces patients ou si elle est retrouvée chez des patients qui sont atteints d'une autre forme de syndrome de Cushing. L'inhibition spécifique de chacun des membres Sp/KLF par des ARN interférences serait aussi une approche intéressante pour déterminer leur rôle spécifique sur les mécanismes de régulation de l'expression du GIPR aussi bien dans les cellules qui expriment que dans les cellules qui n'expriment pas ce récepteur. La cotransfection de ces facteurs avec des fragments du promoteur du GIPR dans les cellules de drosophile SL2, qui n'expriment pas les membres de la famille Sp, pourrait également fournir une piste pour connaître leur effet sur la transcription du GIP.

De nombreux autres facteurs de transcription sont capables de lier les boîtes GC/CACCC. Un de ces facteurs, Egr-1, est particulièrement intéressant puisqu'une étude de profilage à grande échelle a montré une baisse de son expression chez quelques patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Egr-1 est capable de se lier à l'ADN à un site qui chevauche ou qui est juxtaposé aux sites Sp1 et peut agir de manière coopérative ou antagoniste. Puisqu'il a une préférence marquée pour la séquence CCCGCC, il est un candidat potentiel pour lier les sites GC-65/-70 et GC-77/-82 (Figure 4,2). De plus, sa capacité à inhiber la transcription pourrait expliquer l'augmentation de l'activité du gène rapporteur luciférase en présence du mutant pour l'élément de réponse GC-77/-82. Le récepteur β -adrénergique est un exemple de gène régulé par les facteurs de transcription Sp1 et Egr-1 (Bahouth SW et al., 2002). Tout comme pour BTEB1, la modification spécifique de l'expression de ce facteur chez les patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP n'a pas été démontrée.

Le facteur de transcription MAZ, qui agit de manière similaire à Egr-1, pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'expression du GIPR. MAZ est

d'ailleurs connu pour influencer la transcription d'autres récepteurs de la famille du glucagon comme le récepteur de la PTH (Williams LJS et Abou-Samra AB, 2000). L'expression du récepteur à la sérotonine est aussi contrôlée par MAZ et Sp1 (Parks CL et Shenk T, 1996). Tout comme Egr-1, MAZ a une préférence pour la séquence CCCGCC. Egr-2 et ETF (un répresseur) sont deux autres facteurs de transcription qui lient préférentiellement ce consensus. Afin de déterminer le rôle de ces facteurs de transcription sur la régulation de l'expression du GIPR, il serait possible d'inhiber leur expression à l'aide d'ARN interférences dans les lignées cellulaires HeLa et HGT-1. L'immunoprécipitation de la chromatine permettrait également d'étudier les interactions entre ces protéines et le promoteur du GIPR. Brièvement, l'immunoprécipitation de la chromatine consiste à lier les protéines et l'ADN à l'aide d'un traitement au formaldéhyde. L'ADN cible est ensuite clivé en fragments de 500 pb à 1 000 pb par sonication puis immunoprécipité à l'aide d'un anticorps spécifique pour la protéine d'intérêt. Les liens ADN / protéines sont ensuite défaits dans une solution de faible pH et l'ADN est purifié. Cet ADN sert ensuite de modèle pour l'amplification par PCR avec des amorces spécifiques à la région du promoteur potentiellement impliquée dans la liaison avec la protéine. L'amplification d'une bande spécifique confirme la liaison de la protéine au promoteur. L'utilisation du PCR en temps réel permet de mesurer l'affinité relative d'une protéine pour une séquence d'ADN en plus de sa capacité de liaison. De plus, cette méthode a l'avantage de permettre d'étudier les effets d'une stimulation avec différentes substances sur l'interaction protéines / ADN.

Une multitude de co-facteurs peuvent modifier l'activité de Sp1 et pourraient jouer un rôle dans la régulation du hGIPR. Alors que CRSP₃₃ contribue à l'activation de la transcription par Sp1, p74 se lie au domaine activateur afin de bloquer l'interaction entre Sp1 et le complexe initiateur, ce qui inhibe l'activité promotrice. Tout comme Sp1, p74 est une protéine ubiquitaire. Il est donc possible que le contexte cellulaire influence le co-facteur qui est recruté et ainsi

l'effet de Sp1 sur l'expression génique. *In vitro*, la phosphorylation du domaine activateur par la protéine kinase dépendante de l'ADN inhibe d'ailleurs l'interaction entre p74 et Sp1 (Murata et al., 1994).

Puisque la phosphorylation est une modification post-transcriptionnelle qui semble jouer un rôle important dans la capacité de Sp1 à lier l'ADN et à activer la transcription, il serait intéressant d'utiliser des anticorps contre les protéines phosphorylées afin de déterminer le niveau de phosphorylation de ce facteur dans les HeLa et les HGT-1. Il serait également possible d'utiliser des inhibiteurs / activateurs spécifiques à chacune des kinases (exemples généraux : le H89 pour bloquer la PKA ou le TPA pour activer la PKC) de manière à étudier l'effet de cette inhibition dans les cellules qui expriment ou non le GIPR. Le rôle de la cdk2 mériterait également d'être approfondi. Le niveau d'ARNm de la sous-unité 2 de la cdk2 est diminué dans les cellules corticosurréaliennes des patients qui souffrent du syndrome de Cushing dépendant du GIP et cette baisse n'est pas observée chez les patients qui souffrent de la maladie de Cushing (Lampron et al., 2006b). La cdk2 est une kinase impliquée dans l'inhibition de la croissance. La phosphorylation de Sp1 par la cdk2 stimule son affinité de liaison avec sa séquence consensus. La liaison de la sous-unité 2 inhibe l'activité de la cdk2 et la baisse de son expression dans la surrénale des patients pourrait contribuer à stimuler l'expression du GIPR.

Tout comme les kinases, les protéines phosphatases modifient le niveau de phosphorylation de Sp1. Alors que la protéine kinase dépendante de l'ADN active Sp1, la PP1 l'inhibe. La PP1 active joue donc un rôle important dans l'inhibition de la transcription des gènes contrôlés par Sp1. La sous-unité inhibitrice 12 de la PP1, est surexprimée dans la surrénale des patients qui souffrent du syndrome de Cushing par rapport à la surrénale normale (Bourdeau et al., 2004), ce qui suggère que l'activité de Sp1 puisse être augmentée. Toutefois, l'expression de cette sous-unité dans la surrénale des patients qui

souffrent d'une forme différente de syndrome de Cushing n'a pas été déterminée. Afin d'étudier le rôle de la PP1 sur la régulation de l'expression du GIPR, il serait possible de l'inhiber avec l'acide ocadéique dans les HeLa.

Une étude réalisée récemment chez le rat confirme la présence de sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 dans le promoteur du GIPR de rat (Boylan et al., 2006). Cependant, le GIP-R est exprimé dans la surrénale de rat, ce qui suggère des différences au niveau de la régulation du récepteur selon les espèces. La comparaison de la séquence promotrice du GIPR chez le rat et chez l'humain montre que dans le promoteur du rat, le site GC-48/-53, qui ne lie pas Sp1 et Sp3, n'est pas parfaitement homologue, puisqu'un des G est remplacé par un A (CCCCGAG plutôt que CCCCCGGG). Bien que le facteur de transcription capable de lier ce site n'ait pas encore été identifié, il est possible de suggérer l'implication d'un changement de nucléotide sur la capacité de liaison de ce complexe. Le premier site Sp1 (GC-65/-70) contient un C de moins chez le rat, mais la séquence CCCGCC est conservée (CCCCGCC plutôt que CCCCCCCC), ce qui suggère encore une fois que la liaison de Sp1 est similaire pour chacun de ces deux sites. Il en est de même pour le deuxième site de liaison Sp1 (GC-77/-82). Les autres sites de liaison Sp1 (GT-150/-156 ; GT-223/-229 et GC-237/-242), de même que le reste du promoteur sont plus ou moins bien conservés, ce qui semble indiquer que les différences au niveau de l'expression du GIPR dans la surrénale chez le rat et l'humain puissent être dues en partie à ces variations. Toutefois, ces variations devront être approfondies afin d'en déterminer le rôle exact.

Une différence importante d'expression dans l'expression du hGIPR a été observée entre les HeLa et les HGT-1. Dans les cellules HGT-1, qui expriment le GIP-R, la présence d'aussi peu que 75 bp en amont du site d'initiation de la transcription entraîne une augmentation de l'activité du gène rapporteur luciférase d'environ cinq fois le niveau d'activité du vecteur contrôle. Toutefois, dans les cellules HeLa, qui n'expriment pas le GIPR, l'activité luciférase

demeure semblable à celle du vecteur contrôle ou légèrement augmentée (1,5 fois), quelle que soit la longueur du fragment du promoteur du GIPR qui est utilisé (jusqu'à -2 kb), ce qui suggère que la région proximale du promoteur puisse jouer un rôle important dans l'expression cellulaire spécifique du GIPR. Tel que discuté précédemment, il est possible que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 puissent jouer un rôle dans cet effet bien que leur niveau d'ARNm soit le même dans ces deux lignées cellulaires. D'autres membres de la famille Sp/KLF pourraient également jouer un rôle. Par ailleurs, un essai de retardement sur gel montre qu'un complexe, qui ne lie ni Sp1 ni Sp3, semble capable de se lier dans la région du promoteur située entre 0 et -40 pb en présence d'extraits nucléaires d'HGT-1, mais pas en présence d'extraits nucléaires de HeLa. Fait intéressant, avec les extraits nucléaires provenant de tissus surrénaliens (dépendant du GIP, non-dépendant du GIP et normal) le même profil de migration que celui décrit avec les extraits nucléaires de HeLa est observé, ce qui confirme le rôle potentiel de ce complexe dans l'expression tissu spécifique du GIPR, mais exclut son implication dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

Bien que les constructions qui contiennent des fragments plus long du promoteur du hGIPR soient incapables d'activer de manière importante la transcription du gène rapporteur luciférase, les régions affectées négativement dans les HGT-1 semblent également répondre de manière similaire dans les HeLa, ce qui entraîne parfois une activité luciférase inférieure à celle observée avec le vecteur contrôle. Cette observation suggère que les facteurs de transcription inhibiteurs qui se lient dans ces régions d'ADN sont également présents dans les HeLa et contribuent à maintenir la répression de l'expression du GIPR.

4.4 Expression de Sp1, Sp3 et CRSP₃₃

Les études de retardement sur gel que nous avons effectuées montrent que les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 se lient de la même manière dans les

cellules qui expriment ou non le GIPR. De plus, des essais réalisés avec des extraits nucléaires de surrénales normales, de surrénales dépendantes du GIP et de surrénales non dépendantes du GIP montrent que le profil de liaison est similaire à celui observé dans les HeLa, qui n'expriment pas le GIPR. Cependant, il demeure possible qu'*in vivo*, une différence au niveau de l'expression de l'ARNm de ces facteurs de transcription soit impliquée dans les différences d'expression entre les cellules. Des données recueillies par micropuce à sondes oligonucléotidiques sur trois patients avec AIMAH dépendant du GIP, un patient avec AIMAH dépendant du récepteur β -adrénergique et un groupe de contrôles sains suggèrent que l'expression du facteur de transcription Sp1 est la même dans ces tissus, alors que le facteur de transcription Sp3 était surexprimé dans les AIMAH dépendants du GIP. Cette étude suggère également une augmentation de l'expression du co-facteur CRSP₃₃ qui est nécessaire à l'activité de Sp1 (Bourdeau et al., 2004). Afin de confirmer ce résultat sur un plus grand nombre de patients, nous avons analysé le niveau d'expression de Sp1, Sp3 et CRSP₃₃ chez neuf de nos patients atteints du syndrome de Cushing surrénalien dépendant du GIP, de même que chez neuf patients atteints de la maladie de Cushing, sept patients avec un adénome surrénalien non dépendant du GIP et deux patients avec un carcinome surrénalien non dépendant du GIP. Le niveau de protéines de Sp1 et Sp3 a également été déterminé.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que le niveau d'expression de Sp1 est effectivement semblable chez tous les patients et chez les contrôles sains. Bien que le facteur de transcription Sp3 soit effectivement surexprimé chez les patients atteints d'un syndrome de Cushing dépendant du GIP par rapport à la surrénale normale, un niveau plus élevé est aussi observé chez d'autres patients avec syndrome de Cushing non dépendants du GIP, ce qui suggère que la surexpression de ce facteur n'est pas responsable, du moins à lui seul, de l'expression ectopique du GIPR dans les lésions surrénaliennes des patients étudiés. Les niveaux d'ARNm du co-facteur CRSP₃₃, nécessaire à

l'activité de Sp1, semblaient également supérieurs chez les patients AIMAH dépendants du GIP comparativement aux contrôles sains. Toutefois, tout comme pour le facteur de transcription Sp3, ce co-facteur est également surexprimé dans la surrénale de certains autres patients avec syndrome de Cushing non dépendant du GIP. Il n'est donc pas responsable de l'expression ectopique du GIPR chez ces patients. Pour le cofacteur CRSP₃₃, il a été impossible de comparer le profil d'expression protéique, puisque le seul anticorps disponible n'est pas spécifique en immunobuvardage de Western. Il est également intéressant de noter que dans les deux cas de carcinome surrénalien non dépendants du GIP que nous avons étudiés, ni Sp3, ni CRPS₃₃, ne sont surexprimés, ce qui montre bien que cette pathologie implique un mécanisme moléculaire totalement différent.

4.5 Séquençage de Sp3

Bien que peu nombreux, quelques exemples où Sp3 pourrait jouer un rôle dans l'expression cellulaire spécifique d'un gène sont décrits dans la littérature. Un de ces exemples est illustré par l'expression de HERV dans les cellules Ntera2-D1 et les HeLa. Alors que le facteur de transcription Sp1 active la transcription dans les cellules HeLa et les Ntera2-D1, le facteur de transcription Sp3 agit comme activateur dans les cellules Ntera2-D1 et comme répresseur dans les cellules HeLa (Sjottem et al., 1996). Cet exemple est particulièrement intéressant puisqu'il implique la lignée cellulaire HeLa dans laquelle le GIPR n'est pas exprimé. Une des hypothèses pouvant expliquer la différence d'activité du facteur de transcription Sp3 dans les cellules est que l'acétylation de la région inhibitrice nécessaire à l'activité répressive de Sp3 n'a lieu que dans certains types cellulaires. Si tel est le cas, l'impossibilité d'acétyler Sp3 entraînerait la perte de l'activité inhibitrice et donc l'expression aberrante des protéines qui se trouvent sous son contrôle.

Nous avons montré que la région de Sp3 impliquée dans son acétylation ne présente aucune mutation. Cependant, il reste à déterminer si l'acétylation a lieu

au même niveau dans les HeLa et les HGT-1 et si c'est le cas, si une anomalie est présente dans la surrénale des patients avec syndrome de Cushing dépendant du GIP. Le butyrate de sodium (NaB), qui est capable de maintenir le facteur de transcription Sp3 sous forme acétylée, pourrait être utilisé afin de déterminer l'effet de l'acétylation de ce facteur dans les HGT-1. Afin de savoir si le NaB agit directement sur le GIPR ou s'il influence la transcription d'un répresseur, il est possible d'exposer les cellules traitées avec le NaB à la cycloheximine, un inhibiteur puissant de la traduction. Un effet indirect, qui requiert la synthèse de nouvelles protéines, ne sera pas observé en présence de cet inhibiteur. Il est aussi possible de vérifier en transfection si la région qui répond au NaB correspond à l'élément de réponse Sp3. Afin de montrer l'acétylation spécifique de Sp3, il est possible de réaliser un essai à l'aide d'un anticorps contre Sp3 et d'un anticorps contre les lysines acétylées et de comparer le profil de liaison (White et al., 2006). L'immunoprécipitation de l'ADN pourrait également être utilisée afin de mesurer l'affinité des deux formes (acétylées et non acétylées) pour le promoteur du GIPR. À l'opposé, il serait possible d'inhiber la p300, qui catalyse l'acétylation de Sp3, et d'observer l'effet sur la transcription du GIPR dans les HeLa. Le E1A peut être utilisé à cette fin.

4.6 Analyse de la région distale du hGIP-R

L'étude de la région proximale du promoteur du hGIPR nous a procuré d'importantes informations sur la régulation de l'expression basale du hGIPR. Cependant, nous n'avons pas identifié de facteurs de transcription susceptibles d'être impliqués dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing dépendant du GIP. Ceci nous incite à envisager la possibilité qu'une région plus en amont du site d'initiation de la transcription puisse être potentiellement importante dans le développement de cette pathophysiologie. Nous avons donc amorcé une étude de la région distale du promoteur.

L'analyse de la région distale du promoteur du hGIPR a d'abord permis d'identifier deux éléments de réponse nCaRE, fonctionnels *in vitro*, situés à -5

kb en amont du site d'initiation de la transcription. Il reste encore à déterminer l'importance de ces deux éléments de réponse *in vivo*. Cependant, la présence de ces sites dans le promoteur du GIPR est intéressante pour expliquer la baisse d'expression du récepteur qui est observée suite à une stimulation par le GIP, de même que celle observée en présence de glucose, deux effecteurs qui augmentent le niveau de calcium dans la cellule. Si ces sites ont une réelle importance fonctionnelle *in vivo*, ce serait la première fois qu'un élément nCaRE serait caractérisé dans le promoteur d'un récepteur hormonal, ouvrant ainsi la voie à son identification dans le promoteur d'autres récepteurs régulés de manière similaire.

Les essais réalisés jusqu'à présent ont été faits dans les HeLa, une lignée cellulaire qui permet l'entrée passive de calcium dans la cellule. Cependant, les HeLa n'expriment pas le GIPR ce qui rend impossible l'étude des effets d'une modification des niveaux de calcium intracellulaire sur l'expression du GIPR. Afin d'étudier l'effet d'une élévation du calcium dans les cellules qui ne possèdent pas un tel mécanisme de transport, mais qui expriment le GIPR, il est possible d'utiliser un ionophore, qui permet le transport des ions Ca^{2+} à travers la membrane plasmique et le RE. Cependant, une trop forte concentration de Ca^{2+} est toxique pour la cellule et les essais réalisés jusqu'à présent avec le A23187 n'ont pas été concluants. La mise au point des conditions (concentration et temps d'exposition) devra assurément être revue avant que d'autres essais soient envisagés. De plus, le A23187 possède l'avantage de ne pas modifier la balance Na^+/K^+ puisqu'il ne lie pas les ions monovalents. Cependant, d'autres ionophores tels que le X537A, qui n'ont pas cet effet, pourraient aussi être testés.

L'étude préliminaire des deux séquences nCaRE identifiées dans le promoteur du GIPR a permis de démontrer qu'elles sont fonctionnelles et capables de lier des complexes protéiques différents à faibles et hautes concentrations de calcium. Toutefois, la nature et le rôle de ces complexes dans la régulation de

l'expression du GIPR reste encore à déterminer. Le nCaRE identifié dans le promoteur du gène de la PTH lie la protéine APE-1 (aussi appelée Ref-1, APEX ou HAP-1), une protéine multifonctionnelle impliquée aussi bien dans le contrôle de la réponse rédox (activation de facteurs de transcription spécifiques) que dans la réparation de l'ADN ou la régulation de la transcription (Okasaki et al., 1994). APE-1 régulent également sa propre expression par l'intermédiaire d'un nCaRE (Izumi et al., 1996 ; Kuninger et al., 2002). Bien que la liaison de APE-1 à l'élément nCaRE semble possible dans plusieurs cellules, il semble que les co-facteurs qui s'y associent puissent varier. Par exemple, le nCaRE situé dans le promoteur de l'APE-1 semble lier l'APE-1 en combinaison avec hnRNP-L, une protéine connue pour former un complexe avec les pré-mRNA lors du processus de maturation de l'ARNm. Dans d'autres situations, l'APE-1 semble également capable de lier l'antigène Ku (Chung et al., 1996).

Dans les HGT-1, l'activité du promoteur est inhibée lorsque la construction GIPR-473 est transfectée. Toutefois, cette activité est restaurée avec la construction GIPR-595, ce qui suggère qu'il existe entre -336 et -595 pb des sites de liaison qui régulent de manière négative l'expression du GIPR, et ce, même dans les cellules qui expriment le récepteur. Toutefois, l'incapacité de cette région du promoteur à inhiber l'activité d'un promoteur fort SV-40 indique que cette région ne lie pas un répresseur, mais agit plutôt sur la transcription de manière indirecte, soit par la liaison d'un facteur de transcription qui empêche la liaison de facteurs localisés plus en amont, soit par l'interaction d'un facteur capable d'interagir avec d'autres facteurs de transcription situés en amont.

L'analyse de la région du promoteur du hGIP-R située entre -381 et -595 pb montre la présence de certains éléments de réponse potentiels, tel qu'un élément de réponse TGIF/MEIS2, un élément de réponse pour NP-III, une protéine inconnue impliquée dans l'inhibition de la transcription du gène de l' α -fétoprotéine (Zhang et al., 1990 et Zhang et al., 1991), et un élément de réponse Smad3, qui agit également comme répresseur. L'intégrité des sites NP-III et

TGIF/MEIS2 est parfaitement conservée, alors que l'élément de réponse Smad3 présente une différence d'un nucléotide (tgtctgggt plutôt que tgtctgcgt) dans le premier demi-site et de deux nucléotides (tgtatgggt plutôt que tgtctgcgt) dans le second. L'étude de profilage génétique réalisée dans notre laboratoire montre que le facteur de transcription Smad3 est surexprimé dans la surrénale des patients atteints d'un syndrome de Cushing dépendant du GIP par rapport à la surrénale normale. Cependant, Smad3 est également surexprimé dans le tissu surrénalien des patients atteints d'une maladie de Cushing, ce qui indique que ce facteur de transcription n'est pas impliqué dans l'expression ectopique du GIPR. Aucune différence d'expression n'a été observée pour les facteurs TGIF/MEIS2 et NP-III.

Par ailleurs, d'autres éléments de réponse intéressants, mais non caractérisés, ont été identifiés dans le promoteur du GIPR. En se basant sur l'homologie de séquence avec le promoteur de rat et sur l'analyse de sites de liaison potentiels, un élément initiateur a été identifié dans le promoteur du GIPR. Chez le rat, cet élément de réponse correspond au site d'initiation de la transcription et sa séquence est parfaitement conservée chez l'humain (Figure 4,4), mais son rôle fonctionnel n'a pas encore été testé chez aucune de ces deux espèces. Homologue à l'élément initiateur présent dans le promoteur de la Tdt, de CREB et de RAR α , ce consensus possède également le dinucléotide CA caractéristique de ces éléments. La très faible activité transcriptionnelle observée lors de la transfection de la construction GC-48/-53, qui contient l'élément initiateur, suggère que chez l'humain, sa présence ne serait pas suffisante à l'activation de l'expression. Toutefois, de nombreux initiateurs requièrent la présence de Sp1 afin d'activer efficacement la transcription et il est possible que ce soit le cas ici. S'il s'avérait fonctionnel cet initiateur fournirait un indice supplémentaire qui pourrait contribuer à localiser précisément le site d'initiation de la transcription.

CCAGAGCTCCCCGCTTCCGTTCCCTGTCCCGCCTTGGCCCCGCCCCCTCCCAT

-20

CACCCCGGGCTGCCAGCGCCTGTCACCTCTCCCAAGAGCCGAGACAAGGCAGT

rat GTCATCTCTCCCA

Tdt CTCATCTCT

ggaggca

Figure 4,4. Élément initiateur.

4.7 Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette étude n'ont pas permis d'identifier le ou les facteurs de transcription responsables de l'expression ectopique du GIPR dans la surrénale des patients atteints du syndrome de Cushing dépendant GIP. Cependant, ils ont permis de démontrer qu'aucune mutation du promoteur n'est impliquée dans ce processus. Ils ont également permis d'identifier certains des facteurs de transcription impliqués dans l'expression cellulaire du GIP-R en physiologie normale, ainsi que certains sites potentiels pour des facteurs de transcription distaux ouvrant la voie à de nouvelles études visant à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de l'expression ectopique du GIPR chez les patients atteints du syndrome de Cushing dépendant du GIP.

BIBLIOGRAPHIE

Albright F, Butler AM, Hampton AO et Smith P (1937) *Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminate, areas of pigmentation and endocrine dysfunctions, with precocious puberty in females*. New Englang Journal of Medicine 216 : 727.

Almind K, Ambye L, Urhammer SA, Hansen T, Echwald SM et Holst JJ (1998) *Discovery if amino acid variants in the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor : the impact on the pancreatic β -cell responses and functional expression studies in Chinese hamster fibroblast cells*. Diabetologia 41 : 1 194 – 1 198.

Altschuler DL, Peterson SN, Ostrowski MC et Lapetina EG (1995) *Cyclic AMP-dependent Activation of Rap1b*. Journal of Biological Chemistry 270 : 10 373 – 10 376.

Amer KM, Ibrahim NB et Forrester-Wood CP (2001) *Lung carcinoid related to Cushing's syndrome : report of three cases and review of the literature*. Postgraduate Medicine 77 : 464 – 467.

Amiranoff B, Vauclin-Jacques N et Laburthe M (1984) *Functional GIP receptors are in a hamster pancreatic beta cell line In111 : specific binding and biological effects*. Biochemical and Biophysical Research Communication 123 : 671 – 676.

Amiranoff B, Vauclin-Jacques N et Laburthe M (1985) *Interaction of gastric inhibitory polypeptide (GIP) with the insulin-secreting pancreatic beta cell line In 111 : characteristics of GIP binding sites*. Life Sciences 36 : 807 – 813.

Amiranoff B, Couvineau A, Vauclin-Jacques N et Laburthe M (1986) *Gastric inhibitory polypeptide recetor in hamster pancreatic beta cells : direct cross-linking, solubilization, and characterization as a glycoprotein*. European Journal of Biochemistry 159 : 353 – 358.

Amland PF, Jorde R, Aanderup S, Burhol PG et Giercksky KE (1985) *Effect of intravenously infused porcine GIP on serum insulin, plasma C-peptide, and pancreatic polypeptide in non-insulin-dependent diabetes in the fasting state*. Scandinavian Journal of Gastroenterology 20 : 315 – 320.

Aniszewski JP, Young WF et Thompson GB (2001) *Cushing's syndrome due to ectopic adrenocorticotrophic hormone secretion*. World Journal of Surgery 25 : 934 – 940.

Andrews NC et Faller DV (1991) *A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells*. Nucleic Acids Research 11 : 2 499.

Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J et Lacroix A (2004) *Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 91 : 171 – 177.

Antonini SR, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J et Lacroix A (2006) *Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome*. Clinical Endocrinology 64 : 29 – 36.

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B, Johnson RS et Kahn CR (1994) *Alternative pathway of insuline signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene*. Nature 372 : 186 – 190.

Arioglu E, Doppman J et Gomes M (1998) *Cushing's syndrome caused by corticotropin secretion by pulmonary tumorlets*. New England Journal of Medicine 339 : 883 - 886.

Armstrong SA, Barry DA, Leggett RW et Mueller CR (1997) *Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C-terminus of Sp1 decreases its DNA binding activity*. Journal of Biological Chemistry 272 : 13 489 - 13 495.

Arnaldi G, Gasc JM, De Keyser Y, Raffin-Sanson ML, Perraudin V, Kuhn JM, Raux-Demay MC, Luton JP, Clauser E et Bertagna X (1998) *Variable expression of the V₁ vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 : 2 029 - 2 035.

Arnolds J (1866) *Ein Beitrag zu der feiner struktur und dem chemismus der nebennieren*. Virchows Archiv 35 : 64 - 107.

Ascoli M, Fanelli F et Segaloff DL (2002) *The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective*. Endocrine Review 23 : 141 - 174.

Azizkhan JC, Jensen DE, Pierce AJ et Wade M (1993) *Transcription from a TATA-less promoters : dihydrofolate reductase as a model*. Critical Review in Eukaryotic Gene Expression 3 : 229 - 254.

Baert D, Nobels F et Van Crombrugge P (1995) *Combined Conn's and Cushing's syndrome : an unusual presentation of adrenal adenoma*. Acta clinica Belgica 50 : 310 - 313.

Bahouth SW, Beauchamp MJ et Vu KN (2002) *Reciprocal regulation of b1-adrenergic receptor gene transcription by Sp1 and early growth response gene 1 : induction of Egr-1 inhibits the expression of the b1-adrenergic receptor gene*. Molecular pharmacology 61 : 379 - 390.

Baldacchino V, Oble S, Décarie PO, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J et Lacroix A (2005) *The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenal patients with Cushing's syndrome*. Journal of Molecular Endocrinology 35 : 61 - 71.

Balsinde J et Dennis A (1997) *Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A2*. Journal of Biological Chemistry 272 : 16 069 - 16 072.

Barisson MC et Domenice S (2003) *Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutation of GNAS1 gene*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 2 147 - 2 151.

Barrie AP, Clohessy AM, Buensuceso CS, Roger MV et Allen JM (1997) *Pituitary adenyl cyclase-activating peptide stimulates extracellular signal-regulated kinase 1 or 2 (ERK 1/2) activity in a Ras-independent, mitogen-activated protein kinase / ERK kinase 1 or 2-dependent manner in PC-12 cells*. Journal of Biological Chemistry 272 : 19 666 - 19 671.

Beaupain D, Eleouet JF et Romeo PH (1990) *Initiation of transcription of the erythroid promoter of the uroporphobilinogen deaminase gene is regulated by a cis-acting sequence around the cap site*. Nucleic Acids Research 18 : 6 509 - 6 515.

Bell GI, Sanchez-Pescador R, Laybourn PJ et Najarian RC (1983) *Exon duplication and divergence in the human proglucagon gene*. Nature 304 : 368 - 371.

Belcheva MM et Coscia CJ (2002) *Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase*. Neurosignals 11 : 34 - 44.

Bertagna C et Orth DN (1981) *Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951 to 1978)*. American Journal of Medicine 71 : 855 – 875.

Bertagna X, Groussin L, Luton JP et Bertherat J (2003) *Aberrant receptor-mediated Cushing's syndrome*. Hormone Research 59 : 99 – 103.

Bertherat J, Groussin L et Sandrini F (2003) *Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors : 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity*. Cancer Research 63 : 5 308 – 5 319.

Bertherat J, Barrande G et Lefebvre H (2004) *Illegitimate membrane receptors are frequent and often multiple in bilateral ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia*. The Endocrine Society 85th Meeting, Philadelphia, PA (P3-410) : 570.

Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C et Groussin L (2005) *Abnormal sensitivity of the adrenocortical tissue to multiple stimuli in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) causing Cushing's syndrome : in vivo and in vitro studies*. The Endocrine Society's 86th Meeting, New-Orleans, LO (P3-403) : 562.

Beuschtein F Reinke M et Karl M (1994) *Clonal composition of human adrenocortical neoplasms*. Cancer Research 54 : 4 927 – 4 932.

Bilezikjian LM et Vale WW (1983) *Glucocorticoids inhibit corticotrophin releasing factor-induced production of adenosine 3',5'-monophosphate in cultured anterior pituitary cells*. Endocrinology 113 : 657 – 662.

Bird A (1992) *The essentials of DNA methylation*. Cell : 70 : 5 – 8.

Black AR, Black JD et Azizkhan-Clifford J (2001) *Sp1 and Krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer*. Journal of Cellular Physiology 188 : 143 – 160.

Black MC et Azizkhan JC (1989) *Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo*. Molecular and Cellular Biology 9 : 4 994 – 5 002.

Bodner M, Castrillo JL, Theill LE, Deerinck T, Ellisman M et Karin M (1988) *The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein*. Cell 55 : 505 – 518.

Böhm SK, Grady EF et Bunnett NW (1997) *Regulatory mechanisms that modulate signaling by G protein-coupled receptor*. Biochemistry Journal 322 : 1 – 18.

Bohm A, Gaudet R et Sigler PB (1997) *Structural aspects of heterotrimeric G protein signaling*. Current Opinion in Biotechnology 8 : 480 – 487

Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron M, Mulloy AL, Rasmussen H, Qin F, Ding KH et Isales CM (2000) *Osteoblast-Derived Cells Express Functional Glucose-Dependant Insulinotropic Peptide Receptors*. Endocrinology 141 : 1 228 – 1 235.

Bollag RJ, Zhong Q, Ding KH, Phillips P, Zhong L, Qin F, Cranford J, Mulloy AL, Cameron R et Isales CM (2001) *Glucose-dependant insulinotropic peptide is an integrative hormone with osteotropic effects*. Molecular and Cellular Endocrinology 177 : 35 – 41.

Bonny C et Goldberg E (1995) *The CpG-rich promoter of human LDH-C is differentially methylated in expressing and nonexpressing tissues*. Developmental genetic 16 : 210 – 217.

Bornstein SR, Stratakis A et Chrousos GP (1999) *Adrenocortical tumors : recent advances in basic concepts and clinical management*. Annal international of Medicine 130 : 759 – 771.

Borellini F, Aquino A, Josephs SF et Glazer RL (1990) *Increased expression and DNA-binding activity of transcription factor Sp1 in doxorubicin-resistant HL-60 leukemia cells*. Molecular and Cellular Biology 10 : 5 541 – 5 547.

Boscaro M, Barzon L, Fallo F et Sonino N (2001) *Cushing's syndrome*. Lancet 357 : 783 – 791.

Bourdeau I, D'Amour P, Hamet P, Boutin JM et Lacroix A (2001) *Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86 : 5 534 – 5 540.

Bourdeau I et Stratakis CA (2002) *Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease*. Annals of New-York Academy of Sciences 968 : 240 – 255.

Bourdeau I et Lacroix A (2002) *G-protein mutations are infrequent in the adrenal tissues with Cushing's syndrome secondary to ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia*. The Endocrine Society 84th Meeting, San-Francisco, CA(P1-385) : 244.

Bourdeau I, Lacroix A Schurch W, Caron P, Antakly T et Stratakis CA (2003) *Primary pigmented nodular adrenal adrenocortical disease : paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 3 931 – 3 937.

Bourdeau I, Antonini SR et Lacroix A (2004) *Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators*. Oncogene 23 : 1 575 – 1 585.

Bourdeau I, Lampron A et Tadjine M (2005) *Mutations and interstitial deletions involving exon 3 of the beta-catenin gene are detected in sporadic adrenocortical tumors*. The ASHG 55th Annual Meeting, Salt Lake City, BD (4).

Bourdeau I, Matyakhina L et Stergiopoulos SG (2006) *17q22-24 chromosomal losses and alterations of protein kinase a subunit expression and activity in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 91 : 3 626 – 3 632.

Bourdeau I, Lampron A, Soares Costa MH, Tadjine M et Lacroix A (2007) *Adrenocorticotrophic hormone-independent Cushing's syndrome*. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity 14 : 219 – 225.

Bouwman P, Göllner H, Elsässer HP, Eckhoff G, Karis A, Grosveld F, Philipsen J et Suske G (2000) *Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development*. The EMBO Journal 19 : 655 – 661.

Bouwman P et Philipsen S (2002) *Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors*. Molecular and Cellular Endocrinology 195 : 27 – 38.

Boyar RM, Witkin M, Carruth A et Ramsey J (1979) *Circadian cortisol secretory rhythms in Cushing's disease*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 48 : 760-765

- Boyes J et Birol A (1992) *Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength : evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein.* EMBO Journal 11: 327 – 333.
- Boylan MO, Jepeal LI et Wolfe MM (1999) *Structure of the rat glucose-dependant insulinotropic polypeptide receptor gene.* Peptides 20 : 219 – 228.
- Boylan MO, Jepeal LI et Wolfe MM (2006) *Sp1/sp3 binding is associated with cell-specific expression of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene.* American Journal of Physiology, Endocrinology, and Metabolism 290 : 1287-1295
- Brandeis M, Frank D, keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, nemes A, Temper V, Razin A et Cedar H (1994) *Sp1 element protect a CpG island from de novo methylation.* Nature 371 : 435 – 438.
- Braun H, Koop R, Ertmer A, Nacht S et Suske G (2001) *Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation.* Nucleic Acids Research 29 : 4 994 – 5 000.
- Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP et Tjian R (1986) *Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor Sp1.* Science 234 : 47 – 52.
- Brown WH (1928) *A case of pluriglandular syndrome.*
- Brown JC, Pederson RA, Jorpes E et Mutt V (1969) *Preparation of a highly active enterogastrone.* Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 47 : 113 – 114.
- Brown JC et Pederson RA (1970) *A multiparameter study on the action of preparations containing cholecystokinin-pancreozymin.* Scandinave Journal of Gastroenterology 5 : 537 – 541.
- Brown JC, Mutt V et Pederson RA (1970) *Further purification of a polypeptide demonstrating enterogastrone activity.* Journal of Physiology 209 : 57 – 64.
- Brown JC et Dryburgh JR (1971) *A gastric inhibitory polypeptide II. The complete amino acid sequence.* Canadian Journal of Biochemistry 49 : 867 – 72.
- Brown JC, Dryburgh JR, Ross SA et Dupré J (1975) *Identification and actions of gastric inhibitory polypeptide.* Recent Progress in Horm Research 31 : 487 – 532.
- Brush JS, Sutliff LS et Sharma RK (1974) *Metabolic regulation and adenyl cyclase activity of adrenocortical carcinoma cultured cells.* Cancer Research 34 : 1 495 – 1 502.
- Buchan AMJ, Polak JM, Capella C, Solcia E et Pearse AGE (1978) *Electronimmunocytochemical evidence for the k cell localization of gastric inhibitory polypeptide (GIP) in man.* Histochemistry 56 : 37 – 44.
- Bugalho MJ, Li X, Rao CV Soares J et Sobrinho LG (2000) *Presence of a G_{αs} mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome.* Gynecol Endocrinol 14 : 50 – 54.
- Buggy J, Hull J et Yoo-Warren H (1995) *Isolation and structural analysis of the 5' flanking region of the gene encoding the human glucagons receptor.* Biochemical and Biophysical Research Communication 208 : 339 – 344.

Buggy JJ, Livingston JN, Rabin DU et Yoo-Warren H (1995) *Glucagon / glucagon-like peptide 1 receptor chimeras reveal domains that determine specificity of glucagon binding.* Journal of Biological Chemistry 270 : 7 474 – 7 478.

Bymaster F Calligaro DO et Falcone JF (1999) *Arachidonic acid release in cell lines transfected with muscarinic receptors : a simple functional assay to determine response of agonists.* Cellular Signaling 11 : 405 – 413.

Campbell KK, Baysdorfer C, Antonini S et Lacroix A (2004) *V1a vasopressin receptor sequence and expression in adrenal Cushing's syndrome with aberrant response to vasopressin.* The Endocrine 86th Society Meeting, New-Orleans, LA

Candido EP, Reeves R et Davie JR (1978) *Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in culture cells.* Cell 14 : 105 – 115.

Carey RM, Varma SK et Drake CR (1984) *Ectopic secretion of corticotrophin-releasing factor as a cause of Cushing's syndrome : A clinical morphologic and biochemical study.* New England Journal of Medicine 311 : 13 - 20.

Carmichael SW (2003) *A History of the Adrenal Medulla.* <http://webpages.ull.es/user/iscceb12/ChromaffinCell/History.html> Site consulté le 25 octobre 2007.

Cartier D, Lihrmann I, Parmentier F, Bastard C, Bertherat J, Caron P, Kuhn JM, Lacroix A, Tabarin A, Young J, Vaudry H et Lefebvre H (2003) *Overexpression of serotonin 4 receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolisme 88 : 248 – 254.

Casey M, Vaughan CJ et He J (2000) *Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Caney complex.* Journal of Clinical Investigation 106 : 31 – 38.

Cataland S, Crockett SE, Brown JC et Mazzaferri EL (1974) *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man.* Journal of Clinical Endocrinology and metabolism 39 : 223 – 228.

Catt KJ, Carson MC, Hausdorff WP, Leach-Harper CM, Baukal AJ, Guillemette G, Balla T et Aguilera G (1987) *Angiotensin II receptors and mechanisms of action in adrenal glomerulosa cells.* Journal of Biological Chemistry 27 : 915 – 927.

Cazabat L, Ragazzon B, Groussin L et Bertherat J (2006) *PRKARIA mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease.* Pituitary 9 : 211 – 219.

Chabre O, Liakos P, Vivier J, Chaffanjon P, Labat-Moleur F, Martinie M, Bottari SP, Bachelot I, Chambaz EM, Defaye G et Feige JJ (1998) *Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenomas : insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 : 3 134 – 3 143.

Chabre O, Liakos P, Vivier J, Bottari S, Bachelot I, Chambaz EM et Feige JJ (1998) *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulates cortisol secretion, cAMP production and DNA synthesis in an adrenal adenoma responsible for food-dependent Cushing's syndrome.* Endocrine Research 24 : 851 – 856.

Chang L et Karin M (2001) *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature 410 : 37 – 40.

Chen FM, Bilezikjian LM, Perrin MH, Rivier J et Vale WW (1986) *Corticotropin releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain*. Brain Research 381 : 49 – 57.

Chen R, Lewis KA, Perrin MH et Vale WW (1993) *Expression cloning of a human corticotrophin-releasing factor receptor*. Proceeding of the National Academy of Sciences 133 : 3058 – 3061.

Chen M, Yang Z, Naji A et Wolf Ba (1996) *Identification of calcium-dependent phospholipase A2 isoforms in human and rat pancreatic islets and insulin secreting beta cell lines*. Endocrinology 137 : 2 901 – 2 909.

Chen YQ, Su M, Raja Walia R, Hao Q, Covington JW et Vaughan DE (1998) *Spl sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells*. Journal of Biological Chemistry 273 : 8 225 – 8 231.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C et Cobb MH (2001) *MAP kinases*. Chemical Review 101 : 2 449 – 2 476.

Cho GJ, Ryu S, Kim YH, Kim YS, Cheon EW, Park JM, Kim HJ, Kang SS et Choi WS (2002) *Upregulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats*. Current Eye Research 25 : 381 – 388.

Choi YC et Chae CB (1991) *DNA hypomethylation and germ cell-specific expression of testis-specific H2B histone gene*. Journal of Biological Chemistry 266 : 20 504 – 20 511.

Choi YC, Gu W, Hecht NB, Feinberg AP et Chae CB (1996) *Molecular cloning of mouse somatic abd testis-specific H2B histone genes containing a methylated CpG island*. DNA and Cell Biology 15 : 495 – 504.

Chou TY, Hart GW et Dang CV (1995) *c-myc is glycosylated at thréonine 58, a known phosphorylation site ans a mutational hot spot in lymphomas*. Journal of Biological Chemistry 270 : 18 961 – 18 965.

Christopoulos S, Bourdeau I et Lacroix A (2004) *Aberrant expression of hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome*. Pituitary 7 : 225-235.

Chung U, Igarashi T, Nishishita T, Iwanary H, Iwamatsu A, Suwa A, Mimory T, Hata K, Ebisu S, Ogata E, Fujita T et Okasaki T (1996) *The interaction between ku antigen and Ref-1 protein nediates negative gene regulation by extracellular calcium*. Journal of Biological Chemistry 271 : 8 593 – 8 598.

Clapham DE et Neer EJ (1993) *New roles : G protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signaling*. Nature 365 : 403 – 406.

Clapham DE et Neer EJ (1997) *G protein betagamma subunits*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 37 : 167 – 203.

Clark AJ, Baig AH, Noon L, Swords FM, Hunyady L et King PJ (2003) *Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R)*. Annals of the New-York Academy of Sciences 994 : 111 – 117.

- Clerc RG, Corcoran LM, LeBowitz JH, Baltimore D et Sharp PA (1988) *The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeobox-type domains*. *Genes Development* 12 : 1 570 – 1 581.
- Climenti E, Maggaretti N, Meldolesi J et Toramelli R (1990) *A new constitutively activating mutation of G_s protein α subunit gsp oncogene is found in human pituitary tumors*. *Oncogene* 5 : 1 059 – 1 061.
- Comas JM, Archambeaud-Mouveroux F et Teissier MP (1995) *Un nouveau cas d'hypercorticisme induit par l'alimentation*. *Annale d'endocrinologie* 56 : 275.
- Contesse V, Reznik Y, Louiset E, Duparc C, Cartier D et Sicard F (2005) *Abnormal sensitivity of cortisol-producing adrenocortical adenomas to serotonin : in vivo and in vitro studies*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 : 2843 – 2850.
- Cook, Gehelein B et Urrutia R (1999) *Sp1 and its likes : biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors*. *Annals of New-York Academy of Sciences* 880 : 94 – 102.
- Courey AJ et Tjian R (1988) *Analysis of Sp1 in vivo reveals multiples transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif*. *Cell* 55 : 887 – 898.
- Courey AJ, Holtzman DA, Jackson SP et Tjian R (1989) *Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1*. *Cell* 59 : 827 – 836.
- Couvineau A, Amiranoff B, Vauclin-Jacques N et Laburthe M (1984) *The GIP receptor on pancreatic beta cell tumor : molecular identification by covalent cross-linking*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 122 : 283 – 288.
- Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Nicole P et Laburthe M (1995) *Highly conserved aspartate 68, tryptophane 73, and glycine 109 in the N-terminal extracellular domain of the human VIP receptor are essential for its ability to bind VIP*. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 206 : 246 – 252.
- Crespo P, Xu N, Simonds WF et Gutkind JS (1994) *Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G protein betagamma subunits*. *Nature* 369 : 418 – 420.
- Creutzfeldt W and Nauck MA (1992) *Gut hormones and diabetes mellitus*. *Diabetes and Metabolism Reviews* 8 : 149 – 177.
- Crockett SE, Mazzaferri EL et Cataland S (1976) *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) in maturity-onset diabetes mellitus*. *Diabetes* 25 : 931 – 935.
- Croughs RJM, Zelissen PMJ, Van Vroonhoven TJMV, Hofland TJ, N'Diaye N, Lacroix A et deHerder WW (2000) *GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH*. *Clinical Endocrinology* 52 : 235 – 240.
- Cushing HW (1912) *The pituitary body and its disorders*.
- Cushing HW (1932) *The basophilic adenoma of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism)*. *Bulletin Hohn Hopkins Hospital* 50 : 137 -195.
- Daaka Y, Luttrell LM et Lefkowitz RJ (1997) *Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A*. *Nature* 390 : 88 – 91.

D'Addario M, Arora PD et McCulloch CA (2006) *Role of p38 in stress activation of Sp1*. *Gene* 379 : 51 – 61.

Daidoh H, Morita H et Hanafusa J (1998) *In vivo and in vitro effects of AVP and V1a receptor antagonist on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia*. *Clinical Endocrinology* 49 : 403 – 409.

Daniel S, Zhang S, DePaoli-Roach AA et Kim KH (1996) *Dephosphorylation of Sp1 by protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the Acetyl-CoA carboxylase gene*. *Journal of Biological Chemistry* 271 : 14 692 – 14 697.

Deacon CF, Johnsen AH et Holst JJ (1995) *Degradation of glucagons-like peptide 1 by human plasma in vitro yield an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80 : 952 – 957.

Deacon CF, Nauck MA, Toft-Nielsen MB, Pridal L, Willms B et Holst JJ (1995) *Both subcutaneously and intravenously administered glucagons-like peptide 1 are degraded from the NH2-terminus in type 2 diabetic patients and in healthy subjects*. *Diabetes* 44 : 1 126 – 1 131.

De Herder WW, Hofland LJ, Usdin TB, de Jong FH, Uitterlinden P, van Koetsveld P, Mezey E, Bonner TI, Bonjer HJ et Lambert SW (1996) *Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 : 3 168 – 3 172.

De Keyser Y, Auzan C, Lenne F, Beldjord C, Thibonnier M, Bertagna X et Clauser E (1994) *Cloning and characterization of the human V₃ pituitary vasopressin receptor*. *FEBS letters* 356 : 215 – 220.

Demura R, Demura H, Nunokawa T, Baba H et Miura K (1972) *Responses of plasma ACTH, GH, LH and 11-hydroxycorticosteroids to various stimuli in patients with Cushing's syndrome*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 34 : 852 – 859.

Dennig J, Beato M et Suske G (1996) *An inhibitor domain in Sp3 regulates its glutamine-rich activation domains*. *The EMBO Journal* 15 : 5 659 – 5 667.

Deryckere F et Gannon F (1994) *A one hour mini-preparation technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues*. *Biotechniques* 16 : 405.

Desvergne B et Wahli W (1999) *Peroxisome-proliferator activated receptors : nuclear control of metabolism*. *Endocrine Review* 20 : 649 – 688.

Dhanasekaran N, Heasley L et Johnson GL (1995) *G protein-coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis*. *Endocrine Review* 16 : 259 – 270.

Diaz-Cano SJ, de Miguel M, Blanes A, Tashjian R, Gatera H et Wolfe HJ (2000) *Clonality as expression of distinctive cell kinetic patterns in nodular hyperplasias and adenomas of the adrenal cortex*. *American Journal of Pathology* 156 : 311 – 319.

Dickerson CD et Weiss ER (1995) *The coupling of pertussis toxin-sensitive G proteins to phospholipase A2 and adenylyl cyclase in CHO cells expressing bovine rhodopsin*. *Experimental Cell Research* 216 : 46 – 50.

Ding WG et Gromada J (1997) *Protein kinase A-dependent stimulation of exocytosis in mouse pancreatic b-cells by glucose-dependent insulinotropic polypeptide*. *Diabetes* 46 : 615 – 621.

- Ding KH, Zhong Q, Xu J et Isaacs C (2004) *Glucose-dependent insulinotropic peptide : differential effects on hepatic artery vs portal vein endothelial cells*. American Journal of Physiological and Endocrine Metabolism 286 : E773 – E779.
- Dobbie JW et Symington T (1966) *The human adrenal gland with special reference to the vasculature*. Journal of Endocrinology 34 : 479 - 489.
- Drucker DJ, Phillippe J, Mojsov S, Chick WL et Habener JF (1987) *Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cAMP levels in a rat islet cell line*. Proceeding of the National Academy of Sciences 84 : 3 434 – 3 438.
- Drucker DJ (2006) *The biology of incretin hormones*. Cell Metabolism 3 : 153 – 165.
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J et Brownlee M (2000) *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexoamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. Proceeding of the National Academy of Sciences 97 : 12 222 – 12 226.
- Dumont JE, Jauniaux JC et Roger PP (1989) *The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation*. TRENDS in Biochemical Sciences 14 : 67 – 71.
- Dupré J, Watson SA et Brown JC (1973) *Stimulation of insulin secretion by GIP in man*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 37 : 826 – 828.
- Dupre J, Greenidge N, McDonald TJ, Ross SA et Rubinstein D (1976) *Inhibition of actions of glucagons in adipocytes by gastric inhibitory polypeptide*. Metabolism clinical and experimental 25 : 1 197 – 1 199.
- Dumont JE, Jauniaux JC et Roger PP (1989) *The cyclic AMP mediated stimulation of cell proliferation*. Trends in Biochemical Sciences 14 : 67 – 71.
- Dynan WS et Tjian R (1983) *The promoter specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter*. Cell 35 : 79 – 87.
- Dynlacht BD, Hoey T et Tjian R (1991) *Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation*. Cell 66 : 563 – 576.
- Ebert R and Creutzfeldt W (1987) *Gastrointestinal peptides and insulin secretion*. Diabetes Metabolism Reviews 3 : 1 – 16.
- Ebert R, Nauck M et Creutzfeldt W (1991) *Effect of exogenous or endogenous gastric inhibitory polypeptide (GIP) on plasma triglyceride responses in rats*. Hormone and Metabolic Research 23 : 517 – 521.
- Eckel RH, Fujimoto WY et Brunzell JD (1979) *Gastric inhibitory polypeptide enhanced lipoprotein lipase activity in cultured preadipocytes*. Diabetes 28 : 1 141 – 1 142.
- Emami S, Chastre E, Bodéré H, Gespach C, Bataille D et Rosselin G (1986) *Functional receptors for VIP, GIP, Glucagon-29 and -37 in the HGT-1 human gastric cancer cell line*. Peptide 7 (supplément 11) : 121 – 127.
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA et Vinson GP (1998) *Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis*. Endocrine Review 19 : 101 – 143.

Ehses JA, Lee SST, Pederson RA et McIntosh CHS (2001) *A new pathway for glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor signaling – evidence for the involvement of phospholipase A in GIP-stimulated insulin secretion.* Journal of Biological Chemistry 276 : 23 667 – 23 673.

Ehses JA, Pelech SL, Pederson RA et McIntosh CHS (2002) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide activates the Raf-MEK1/2-ERK1/2 module via a cyclic AMP / cAMP-dependent protein kinase / Rap1-mediated pathway.* Journal of Biological Chemistry 277 : 37 088 – 37 097.

Elahi D, Andersen DK, Muller DC, Tobin JD, Brown JC et Andres R (1984) *The enteric enhancement of glucose-stimulated insulin release : the role of GIP in aging, obesity, and non-insulin-dependent diabetes mellitus.* Diabetes 33 : 950 - 957.

Elahi D, McAloon DM, Fukagawa NK, Meneilly GS, Schlafer AL et Minaker KL (1994) *The insulinotropic action of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagons-like peptide 1 (7-36) in normal and diabetic subject.* Regulatory Peptide 51 : 63 – 74.

Eustachi B (1563) *Tabulae anatomicae clarissimi viri bartholomaei Eustachii quas.*

Falko JM, Crockett SE, Catalanf S et Mazzaferri EL (1975) *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 41 : 260 – 265.

Farilla L, Bulotta A, Hirshberg B, Li calzi S, Khoury N, Noushmehr H, Bertolotto C, DiMario U, Harlan DM et Perfetti R (2003) *Glucagon-like peptide 1 inhibits cell apoptosis and improved glucose responsiveness on freshly isolated human islets.* Endocrinology 144 : 5 149 – 5 158.

Feelders RA, Lamberts SW, Hofland LJ, Van Koetsveld PM, Verhoef-Post M, Themmen AP, de Jong FH, Bonjer HJ, Clark AJ, Van der Lely AJ et de Herder WW (2003) *Luteinizing hormone (LH)-responsave Cushing's syndrome : the demonstration of LH receptor messenger ribonucleic acid in hyperplastic adrenal cells, which respond to chorionic gonadotropin and serotonin agonists in vitro.* Journal of Endocrinology and Metabolism 88 : 230 – 237.

Fehmann HC, Gherzi R et Göke B (1995) *Regulation of islet hormone gene expression by incretin hormones.* Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes 103 : 56 – 65.

Fehmann HC, Göke R et Göke B (1995) *Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagons-like peptide-1 and glucose-dependent insulin releasing polypeptide.* Endocrine Review 16 : 390 – 410.

Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC et Aron DC (1993) *Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 76 : 189 – 191.

Fineman MS, Bicsak TA, Shen LZ, Taylor K, Gaines E, Varns A, Kim D et Baron AD (2003) *Effect on glycemic control of exenatide (synthetic exendin-4) additive to existing metformin and/or sulfonyurea treatment in patients with type 2 diabetes.* Diabetes Care 26 : 2 370 – 2 377.

Flatt PR, Kwasowski P, Howland RJ et Bayley CJ (1991) *Gastric inhibitory polypeptide and insulin responses to orally administred amino acids in genetically obese hyperglycaemic (ob/ob) mice.* Journal of Nutrition 121 : 1 123 – 1 128.

Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Percira MA, Zerbini MC, Lucon AM et Mendonca BB (2003) *Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 2 147 – 2 151.

Freiman RN et Tjian R (2002) *A Glutamine-rich trail leads to transcription factors*. Science 296 : 2149 - 2150.

French SW, Malone CS, Shen RR, Renard M, Henson SE, Miner MD, Wall R et Teitell MA (2002) *Sp1 transactivation of the TCL1 oncogene*. Journal of Biological Chemistry 278 : 948 - 955.

Frodin M, Sekine N, Roche E, Filloux C, Prentky M, Wollheim CB et Oberghen EV (1995) *Glucose, other secretagogues, and nerve growth factor stimulate mitogen-activated protein kinase in the insulin-secreting beta-cell line, INS-1*. Journal of Biological Chemistry 270 : 7 882 – 7 889.

Fukase N, Igarashi M, Takahashi H, Yamatani K, Daimon M, Tominaga M et Sasaki H (1993) *Hypersecretion of truncated glucagon-like peptide 1 and gastric inhibitory polypeptide in obese patients*. Diabetes and Metabolism 10 : 44 – 49.

Gagnon R (1956) *The venous drainage of the human adrenal gland*. Revue Canadienne de Biologie 14 : 350 - 359.

Gagnon R (1957) *The arterial supply of the human adrenal gland*. Revue Canadienne de Biologie 16 : 421 - 433.

Gallo-Payet N et Guillon G (1998) *Regulation of adrenocortical function by vasopressin*. Hormone and Metabolism Research 30 : 360 – 367.

Gallo-Payet N et Payet M (2003) *Mechanism of action of ACTH : beyond cAMP*. Microscopy Research and Technique 61 : 275 – 287.

Gallwitz B, Witt M, Morys-Wortmann C, Fölsch UR et Schmidt WE (1996) *GLP-1 / GIP chimeric peptides define the structural requirements for specific ligand-receptor interaction of GLP-1*. Regulatory Peptides 63 : 17 – 22.

Gao ZH, Suppota S, Liu J, Heikkilä P, Jänne J et Voutilainen R (2002) *Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 et IGFII genes in adrenocortical tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87 : 1 170 – 1 176.

Gardiner-Garden M et Frommer M (1987) *CpG islands in vertebrate genomes*. Journal of Molecular Biology 196 : 261 – 292.

Garrington TP et Johnson GL (1999) *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. Current Opinion in Cell Biology 11 : 211 – 218.

Gaudin P, Couvineau A, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C et Laburthe M (1995) *Mutational analysis of cysteine residues within the extracellular domains of the human vasoactive intestinal peptide (VIP) 1 receptor identifies seven mutants that are defective in VIP binding*. Biochemical and Biophysical Research Communication 211 : 901 – 908.

Gautam N, Downes GB, Yan K et Kisselev O (1998) *The G protein betagamma complex*. Cellular signaling 10 : 447 – 455.

Gault Va, Flatt PR et O'Harte FP (2003) *Glucose-dependent insulintropic polypeptide analogues and their therapeutic potential for the treatment of obesity-diabetes*. Biochemical and Biophysical Research Communication 308 : 207 – 213.

Gautier JF, Fetita S, Sobngwi E et Salaun-Martin C (2005) *Biological actions of the incretins GLP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes*. Diabetes and Metabolism 31 : 233 – 242.

Gelling RW, Wheeler MB, Xue J, Gyomerey S, Nian C, Pederson RA, McIntosh CH (1997) *Localization of the domains involved in ligand binding and activation of the glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor*. Endocrinology 138 : 2 640 – 2 643.

Gespach C, Emami S et Rosselin G (1984) *Gastric inhibitory polypeptide (GIP), pancreatic glucagons and vasoactive intestinal peptide (VIP) are camp-inducing hormones in the human gastric cancer cell line HGT-1 : Homologous desensitization of the VIP receptor activity*. Biochemical and Biophysical Research Communication 120 : 641 – 649.

Gicquel C, Leblond-Francillard M et Bertagna X (1994) *Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas*. Clinical Endocrinology 40 : 465 – 477.

Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP et Le Bouc Y (1997) *Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors : study on a series of 82 tumors*. The journal of clinical endocrinology and metabolism 82 : 2559 – 2565.

Gicquel C, Baudin E, Lebouc Y et Schlumberger M (1997) *Adrenocortical carcinoma*. Annals of oncology 8 : 423 – 427.

Gicquel C, Bertagna X et Gaston V (2001) *Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors*. Cancer Research 61 : 6 762 – 6 767.

Gicquel C (2001) *17p13 LOH, 11p15 LOH, and overexpression of the IGF-2 gene : prognostic implications in a large series of sporadic adrenocortical tumors*. Cancer Research 61 : 6 762 – 6 767.

Gill G, Pascal E, Tseng ZH et Tjian R (1994) *A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAF_{II}110 component of the drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation*. Biochemistry 91 : 192 – 196.

Giraldi FP, Moro M et Cavagnoni F (2003) *Gender-related differences in the presentation and course of Cushing's disease*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 1 554 – 1 558.

Goldberg HJ, Whiteside CI et Fantus IG (2002) *The hexoamine pathway regulates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter and Sp1 transcriptional activation through protein kinase C- β 1 and - δ* . Journal of Biological Chemistry 277 : 33 833 – 33 841.

Göllner H, Dani C, Phillips B, Philipsen S et Suske G (2001) *Impaired ossification in mice lacking the transcription factor Sp3*. Mechanisms of Development 106 : 77 – 83.

Goodarzi MO, Dawson DW et Li X (2003) *Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 73 – 77.

Grahame-Smith DG, Butcher RW, Ney RL et Sutherland EW (1967) *Adenosine 3''5'' monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotropin on the adrenal cortex*. Journal of Biological Chemistry 242 : 5 535 – 5 541.

Greenspan Francis S et Stewler Gordon J (1997) *Basic & Clinical Endocrinology*, 5^e édition, Appleton & Lange , Stamford, Connecticut, 823 pages.

Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N et Froguel P (1995) *Cloning, Functional expression and Chromosomal Localization of the Human Pancreatic Islet Glucose-dependant Insulinotropic Polypeptide Receptor*. Diabetes 44 : 1 202 – 1 208.

Groussin L, Massias JF, Bertagna X et Bertherat J (2000) *Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R*. The journal of clinical endocrinology and metabolism 85 : 345 – 354.

Groussin L, Perlemoine K et Contesse V (2002) *The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87 : 1 980 – 1 985.

Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Louvel A, Leheup B, Luton JP, Bertagna X et Bertherat J., (2002) *Mutations of the PRKARIA gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD)*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87 : 4 324 – 4 329.

Groussin L, Bertherat J, Gicquel C, le Bouc Y et Bertagna X (2007) *Insights into the molecular biology of adrenocortical tumors*. Experimental and clinical endocrinology and diabetes 155 : 175 – 178.

Gu W et Roeder RG (1997) *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain*. Cell 90 : 595 – 606.

Guntniak M, Orskov C, Holst JJ, Ahren B et Efendic S (1992) *Antidiabetogenic effect of glucagons-like peptide 1 [7-36] amide in normal subject and in patients with diabetes mellitus*. New England Journal of Medicine 326 : 1 316 – 1 322.

Gutkind JS (1998) *The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades*. Journal of Biological Chemistry 273 : 1 839 – 1 842.

Habener JF (1993) *The incretin notion and its relevance to diabetes*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 22 : 775 – 794.

Hagen G, Muller S, Beato M et Suske G (1992) *Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins : a family of Sp1 related genes*. Nucleic Acids Research 20 : 5 519 – 5 525.

Hagen G, Müller S, Beato M et Suske G (1994) *Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3*. The EMBO Journal 13 : 3 843 – 3 851.

Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P et Bolte E (1987) *Cushing's syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis*. Clinical Investigation Medicine 10 : 530 – 533.

Hansotia T, Baggio U, Delmeire D, Hinke SA, Yamada Y et Tsukiyama K (2004) *Double incretin receptor knock-out (DIRKO) mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory action of DPP-IV inhibitors*. Diabetes 53 : 1 326 – 1 335.

Hanukoglu I (1992) *Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis*. The Journal of Steroid Biochemistry and. Molecular Biology 43 : 779 – 804.

Hariharan N et Perry RP (1990) *Functional dissection of a mouse ribosomal protein promoter : significance of the polypyrimidine initiator an element in the TATA-box region*. Proceeding of the National Academy of Sciences 87 : 1 526 – 1 530.

Hartmann H, Ebert R et Creutzfeldt W (1986) *Insulin-dependent inhibition of hepatic glycogenolysis by gastric inhibitory polypeptide (GIP) in perfused rat liver*. Diabetologia 29 : 112 – 114.

Hashimoto K, Kawada Y, Murakami K, Hattori T, Suemaru S et Kageyama J (1986) *Cortisol responsiveness to insulin-induced hypoglycemia in Cushing's syndrome with huge nodular adrenocortical hyperplasia*. Endocrinologia Japonica 33 : 479 – 487.

Hauner H, Glatting G, kaminska D et Pfeiffer EF (1988) *Effects of gastric inhibitory polypeptide on glucose and lipid metabolism of isolated rat adipocytes*. Annals of Nutrition and Metabolism 32 : 282 – 288.

Hayashi Y, Takeda Y, Kaneko K, Koyama H, Aiba M, Ikeda U et Shimada K. (1998) *A case of Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular hyperplasia associated with excessive secretion of mineralocorticoid*. Endocrine Journal 45 : 485 – 491.

Hepler JR et Gilman AG (1992) *G proteins*. TRENDS in Biochemical Sciences 17 : 383 – 387.

Herbach N, Goeke B, Schneider M, Hermanns W, Wolfe E et Wanke R (2005) *Overexpression of a dominant negative GIP receptor in transgenic mice results in disturbed postnatal pancreatic islet and beta-cell development*. Regulatory Peptides 125 : 103 – 117.

Higashimoto Y, Opara EC et Liddle RA (1995) *Dietary regulation of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) gene expression in rat small intestine*. Comparative Biochemistry and Physiology 110 : 207 – 214.

Hirata Y, Uchihashi M, Sueoka S, Matsukura S et Fujita T (1981) *Presence of ectopic β -adrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 53 : 953 – 957.

Hirose Y et Manley JL (2000) *RNA polymerase II and the integration of nuclear events*. Genes and Development 14 : 1 415 – 1 429.

Holst JJ (1994) *Glucagon-like peptide I : a newly discovered gastrointestinal hormone*. Gastroenterology 107 : 1 848 – 1 855.

Holst JJ, Gromada J et Nauck MA (1997) *The pathogenesis of NIDDM involves a defective expression of the GIP receptor*. Diabetologia 40 : 984 – 986.

Holst JJ (1999) *Glucagon-like peptide I : a gastrointestinal hormone with a pharmaceutical potential*. Current Medicinal Chemistry 6 : 1 005 – 1 017.

Holst JJ et Orskov C (2001) *Incretin hormones : an update*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 234 : 75 – 85.

Holst JJ (2002) *Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagons-like peptide 1*. Diabetes and Metabolic Research Review 18 : 430 – 441.

Holst JJ et Gromada J (2004) *Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans*. American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism 287 : E199 – E206.

Honda T, Nakamura T, Saito Y, Ohyama Y, Sumino H et Kurabayashi M (2001) *Combined primary aldosteronism and preclinical Cushing's syndrome : an unusual case presentation of adrenal adenoma*. Hypertension Research 24 : 723 – 726.

Horiba N, Suda T et Aiba (1995) *Lysin vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80 : 2 336 – 2 341.

Horvath A, Boikos S et Giatzakis C (2006) *A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia*. Nature Genetic 38 : 794 – 800.

Houslay MD et Kolch W (2000) *Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling*. Molecular Pharmacology 58 : 659 – 668.

Howlett TA, Rees LH et Besser GM (1985) *Cushing's syndrome*. Clinics in Endocrinology and Metabolism 14 : 911 – 945.

Iida K, Kaji H et Matsumoto H (1997) *Adrenocorticotrophin-independent macronodular adrenal hyperplasia in a patient with lysine vasopressin responsiveness but insensitivity to gastric inhibitory polypeptide*. Clinical Endocrinology 47 : 739 – 745.

Iguchi-Ariga SM et Schaffner W (1989) *CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer / promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation*. Genes and Development 3 : 612 – 619.

Ilias I, Torpy DJ et Pacak K (2005) *Cushing's syndrome due to ectopic corticotrophin secretion : twenty years experience at The National Institutes of Health*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 90 : 4 955 - 4962.

Imai T, Seo H, Murata Y, Funahashi H, Satoh Y, Sasano H., Matsui N et Takagi H. (1991) *Dexamethasone-non suppressible cortisol in two cases with aldosterone-producing adenoma*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 72 : 575 – 581.

Imataka H, Sogawa K, Sasano K, Kobayashi A, Hayami M et Fujii-Kuriyama Y (1992) *Two regulatory proteins that bind two the basic transcription element (BTE), a GC box sequence in the promoter region of the rat P4501A1 gene*. The EMBO Journal 11 : 3 663 – 3 671.

Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolfe AP et Ge H (1997) *Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferase*. Current Opinion in Biology 7 : 689 – 692.

Imohl M, Koditz R et Stachon A (2002) *[Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome : follow-up after unilateral adrenalectomy]*. Medizinische Klinik 97 : 747 – 753.

Inagaki N, Seino Y, Takeda J, Yano H, Yamada Y, Bell GI, Eddy RL, Fukushima Y, Byers MG et Shows TB (1989) *Gastric inhibitory polypeptide : structure and chromosomal localization of the human gene*. *Molecular Endocrinology* 3 : 1 014 – 1 021.

Ingraham HA, Chen RP, Mangalam HJ, Elsholtz HP, Flynn SE, Lin CR, Simmons DM, Swanson L et Rosenfeld MG (1988) *A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype*. *Cell* 55 : 519 – 529.

Izumi T, Henner WD et Mitra S (1996) *Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein*. *Biochemistry* 35 : 14 679 – 14 683.

Itagaki E, Nozaki M, Abe Y, Takizawa M, Furukawa H et Murakawa S (1989) *Direct effect of lysine-vasopressin on cortisol production in isolated adrenal cells from nodular adrenocortical hyperplasia*. Mantero F (Ed) *Serono Symposia*, Raven Press, New-York 57 : 403 – 408.

Jackson SP et Tjian R (1988) *O-glycosylation of eukaryotic transcription factors : implications for mechanisms of transcriptional regulation*. *Cell* 55 : 125 – 133.

Jackson SP, MacDonald J et Tjian R (1990) *GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase*. *Cell* 63 : 155 – 165.

Jiang Y, Cypress AM, Muse ED, Wu CR, Unson CG, Merrifield RB et Sakmar TP (2001) *Glucagon receptor activates extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 via cAMP-dependent protein kinase*. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 98 : 10 102 – 10 107.

Jones IR, Owens DR, Moody AJ, Luzio SD, Morris T et Hayes TM (1987) *The effect of glucose-dependent insulinotropic polypeptide infused at physiological concentrations in normal subjects and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients on glucose tolerance and β -cell secretion*. *Diabetologia* 30 : 707 – 712.

Jones IR, Owens DR, Luzio S, Williams S et Hayes TM (1989) *The glucose-dependant insulinotropic polypeptide response to oral glucose and mixed meals is increased in patients with type 2 (non-insulinodependent) diabetes mellitus*. *Diabetologia* 32 : 668 – 677.

Jones KA, Yamamoto KR et Tjian R (1985) *Two distinct transcription factors binds to the HSV thymidine kinase promoter in vitro*. *Cell* 42 : 559 – 572.

Jones PL, Veevstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J et Wolffe AP (1998) *Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription*. *Nature Genetic* 19 : 187 – 191.

Jorde R et Burhol PG (1987) *The insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in non-insulin-dependent diabetes*. *Italian Journal of Gastroenterology* 19 : 76 – 78.

Jörnvall H, Carlquist M, Kwauk S, Otte SC, McIntosh HS, Brown JC et Mutt V (1981) *Amino acid sequence and heterogeneity of gastric inhibitory polypeptide (GIP)*. *FEBS letters* 123 : 205 – 210.

Jüppner H, Schioani E, Bringham FR, McClure I, Keutmann HT, Potts JT, Kronenberg HM, Abou-Samra AB, Segre GV et Gardella TJ (1994) *The extracellular amino-terminal region of the parathyroid hormone (PTH) / PTH-related peptide receptor determines the binding affinity for the carboxy-terminal fragments of PTH-(1-34)*. *Endocrinology* 134 : 879 – 884.

- Kadonaga JT, Jones KA et Tjian R (1986) *Promoter-specific activation of RNA polymerase II transcription by Sp1*. Trends in biochemical sciences 11 : 20 – 23.
- Kadonaga JT, Carner KR, MarsiarzFR et Tjian R (1987) *Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain*. Cell 51 : 1 079 – 1 090.
- Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J et Tjian R (1988) *Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation*. Sciences 242 : 1 566 – 1 570.
- Kaplan AM et Vigna SR (1994) *Gastric inhibitory polypeptide (GIP) binding sites in rat brain*. Peptides 15 : 297 – 302.
- Karlseder J, Rotheneder H et Wintersberger E (1996) *Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F*. Molecular and Cellular Biology 16 : 1 659 – 1 667.
- Kass SU, Landsberger N et Wolffe AP (1997) *DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation*. Current Opinion in cell Biology 7 : 157 - 165.
- Katz MS, Kelly TM, Dax EM, Pineyro MA, Partilla JS et Gregerman RI (1985) *Ectopic β -adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinoma*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 60 : 900 – 909.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Houseman DE et Graybiel AM (1998) *A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1*. Science 282 : 2 275 – 2 279.
- Kieffer TJ, Verchere CB, Fell CD, Huang Z, Brown JC et Pederson RA (1993) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulated insulin released from a tumor-derived β -cell line (β TC3)*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 71 : 917 – 922.
- Kieffer TJ, McIntosh CHS et Pederson RA (1995) *Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV*. Endocrinology 136 : 3 585 – 3 596.
- Kim SJ, Choi WS, Mou Han JS, Warnock G, Tedida D et McIntosh CHS (2005) *A novel mechanism for the suppression of a voltage-gated potassium channel by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) : protein kinase A (PKA)-dependent endocytosis*. Journal of Biological Chemistry 280 : 28692 - 28700.
- Kim SJ, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y et McIntosh CHS (2005) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic β -cell survival is dependent upon phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) / Protein kinase B (PKB) signalling, activation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression*. Journal of Biological Chemistry 280 : 22 297 – 23 307.
- Kingsley C et Winoto A (1992) *Cloning of GT box-binding proteins : a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression*. Molecular and Cellular Biology 12 : 4 251 – 5 261.
- Kirschner LS, Carney JA et Pack (2000a) *Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with Carney complex*. Nature Genetic 26 : 89 – 92.

Kirschner LS, Sandrini F et Monbo J (2000b) *Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKARIA gene in patients with the Carney complex*. Human Molecular Genetic 9 : 3 037 – 3 046.

Kitazawa S, Kitazawa R et Maeda S (1999) *Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region*. Journal of Biological Chemistry 274 : 28 787 – 28 793.

Knapper JM, Puddicombe SM, Morgan LM et Fletcher JM (1995) *Investigation into the actions of glucose-dependent insulintropic polypeptide and glucagons-like petide-I (7 - 36) amide on lipoprotein lipase activity in explants of rat adipose tissue*. Journal of Nutrition 125 : 183 – 188.

Knight SW, Vulliamy TJ, Morgan B, Devriendt K, Mason PJ et Dokal I (2001) *Identification of a novel DKC1 mutations in patients with dyskeratosis congenital : implications for a pathophysiology and diagnosis*. Human Genetic 108 : 299 – 303.

Ko HS, Fast P, McBride W et Staudt LM (1988) *A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain*. Cell 55 : 135 – 144.

Koch CA (2002) *The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87 : 5 367 – 5 384.

Kogire M, Inoue K, Sumi S, Doi R, Takaori K, Yun M, Fujii N, Yajima H et Tobe T (1988) *Effects of synthetic human gastric inhibitory polypeptide on splanchnic circulation in dogs*. Gastroenterology 95 : 1 636 – 1 640.

Kouzarides T et Ziff E (1988) *The role of the leucine zipper in the fos-jun interactions*. Nature 336 : 646 – 651.

Krarup T, Saurbrey N, Moody AJ, Kuhl C et Madsbad S (1984) *Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on beta-cell function in type I and II diabetes mellitus*. Metabolism 36 : 677 – 682.

Krarup T, Holst JJ et Larsen KL (1985) *Responses and molecular heterogeneity of IR-GIP after intraduodenal glucose and fat*. American Journal of Physiology 249 : E195 – E200.

Krarup T, Saurbrey N, Moody AJ Kuhl C et Madsbas S (1987) *Effect of porcine gastric inhibitory polypeptide on b-cell function in type 1 and type 2 diabetes mellitus*. Metabolism 36 : 677 – 682.

Kubota A, Yamada Y, Hayami T, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Kagimoto S, Watanabe R, Taminato T, Tsuda K et Seino Y (1996) *Identification of two misense mutations in the GIP receptor gene. A functional study and association analysis with NIDDM : no evidence of association wit Japanese NIDDM subjects*. Diabetes 45 : 1 701 – 1 715.

Kubota A, Yamada Y, Yasuda K, Someya Y, Ihara Y, Kagimoto S, Watanabe R, Kuroe A, Ishida H et Seino Y (1997) *Gastric inhibitory polypeptide activates MAP kinase through the wortmannin-sensitive and insensitive pathways*. Biochemical and Biophysical Research Communication 235 : 171 – 175.

Kumar AP et Butler AP (1999) *Enhanced Sp1 binding activity in murine keratinocyte cell lines and epidermal tumors*. Cancer Letters 137 : 159 – 165.

Kuninger DT, Izumi T, Pappaconstantinou J et Mitra S (2002) *Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter*. Nucleic Acids Research 30 : 823 – 829.

Kuo MH et Allis DC (1998) *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. BioEssays 20 : 615 – 626.

Kwasowski P, Flatt PR, Bayley CJ et Marks V (1985) *Effect of fatty acid chain length and saturation on gastric inhibitory polypeptide release in obese hyperglycaemic (ob/ob) mice*. Bioscience Reports 5 : 701 – 705.

Laboisie CL, Augeron C, Couturier-Turpin, MH, Gespach C, Cheret AM et Poter F (1982) *Characterization of a newly established human gastric cancer cell line HGT-1 bearing histamine H₂-receptors*. Cancer Research 42 : 1541 – 1548.

Lacroix A, Bolté E, Tremblay J, Dupré J, Poitras P, Fournier H, aron J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, Flanagan RJ, Hamet P (1992) *Gastric inhibitory polypeptide-dependant cortisol hypersecretion - a new cause of Cushing's syndrome*. New England Journal of Medicine 327 : 974 – 980.

Lacroix A, Bolté E, Tremblay J et Hamet P (1993) *Syndrome de Cushing induit par le GIP : expression clinique d'un récepteur ectopique*. M/S 9 : 706 - 715.

Lacroix A (1995) *Rôle des anomalies des récepteurs hormonaux dans la physiopathologie des tumeurs corticosurréaliennes*. Annales d'Endocrinologie 56 : 614 – 616.

Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M et Hamet P (1997) *Propanolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome*. New England Journal of Medicine 337 : 1 429 – 1434.

Lacroix A, Tremblay J, Touyz RM, Deng LY, Larivière R, Cusson JR, Schiffrin EL et Hamet P (1997) *Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V₁-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independant macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome and orthostatic hypotension*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 82 : 2 414 – 2 422.

Lacroix A, Hamet P et Boutin JM (1999a) *Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome*. New England Journal of Medicine 341 : 1 577 – 1 581.

Lacroix A, Mircescu H et Hamet P (1999b) *Clinical evaluation of the presence of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome*. The Endocrinologist 9 : 9 – 15.

Lacroix A, N'Diaye N, Tremblay J et Hamet P (2001) *Ectopic and abnormal hormones receptors in adrenal Cushing's syndrome*. Endocrine Review 22 : 75 – 110.

Lacroix A et Bourdeau I (2002) *Bilateral adrenal Cushing's syndrome : macronodular adrenal hyperplasia and primary pigmented nodular adrenocortical disease*. Journal of Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 34 : 441 – 458.

Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P et Tremblay J (2004) *Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors*. Trends in Endocrinology and Metabolism 15 : 375 – 382.

Lampron A, Schurch W et Lacroix A (2006a) *Localization of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor in human adrenal tissue by immunohistochemistry*. The Endocrine Society's 88th Meeting, Boston (P3-725)

Lampron A, Martin M, Bourdeau I et Lacroix A (2006b) *Aberrant regulation of aldosterone secretion mediated by several receptors including GIPR in an aldosterone-secreting adenoma*. Adrenal & Molecular Steroidogenesis Meeting, Boston (45).

Lampron A, Oble S, Bourdeau I et Lacroix A (2007) *Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) stimulates aldosterone production in normal human adrenal gland*.

Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR et Vallar L (1989) *GTPase inhibiting mutations activate the α chain of G_s and stimulate adenylate cyclase in human pituitary tumors*. Nature 340 : 692 – 696.

Landshulz WH, Johnson PF et McKnight SL (1988) *The leucine zipper : a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins*. Science 240 : 1 759 – 1 764.

Lankat-Buttgereit B et Göke B (1997) *Cloning and characterization of the 5' flanking sequences (promoter region) of the human GLP-1 receptor gene*. Peptides 18 : 617 – 624.

Lardinois CK, Richeson RB, Starich GH, Mazzu D et Mazzaferri EL (1990) *Gastric inhibitory polypeptide mechanisms of augmenting insulin secretion*. Life Science 47 : 1 015 – 1 022.

Larsen JL, Cathey WJ et Odell WD (1986) *Primary adrenocortical nodular dysplasia, a distinct subtype of Cushing's syndrome : case report and review of the literature*. American Journal of Medicine 80 : 976 - 984.

Latronico AC, Reincke M et Mendonca BB (1995) *No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80 : 875 - 877.

Latronico AC et Chrousos GP (1997) *Extensive personal experience : adrenocortical tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 82 : 1 317 – 1 324.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM et Mendonca BB (2001) *An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors*. The journal of clinical endocrinology and metabolism 86 : 4970 – 4973.

Lebrethon MC, Avallet O, Reznik Y, Archambeaud F, Combes J, Usdin TB, Narboni G, Mahoudeau J et Saez JM (1998) *Food-dependent Cushing's syndrome : characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients*, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 : 4 514 – 4 519.

Ledent C, Dumont JE, Vassart G et Parmentier M (1992) *Thyroid expression of an adenosine receptor transgene induces thyroid hyperplasia and hyperthyroidism*. EMBO Journal 11 : 537 – 542.

Lee DK, Sun D, Edenberg HJ et Hur MW (2002) *POZ. Domain transcription factor FBI₁ repress transcription of ADH5 / FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Spl*. Journal of Biological Chemistry 277 : 26 761 – 26 768.

Lee JS, Galun KM et Shi Y (1993) *Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Spl*. Proceeding of the National Academy of Sciences 90 : 6 145 - 6 149.

Lee S, Hwang R et Lee J (2005) *Ectopic expression of vasopressin V_{1b} and V_2 receptors in the adrenal glands of familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia*. Clinical Endocrinology 63 : 625 – 630.

Leech CA, Holz GG et Habener JF (1994) *Voltage-independent calcium channels mediate slow oscillations of cytosolic calcium that are glucose-dependent in pancreatic β -cells*. Endocrinology 135 : 365 - 372.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AAJ, Wolf LM et Vaudry H (1992) *Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₁ receptor subtype*. Neuroscience 47 : 999 – 1 007.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H et Kuhn JM (1998) *Serotonergic regulation of adrenocortical function*. Hormonal Research 30 : 398 – 403.

Lefebvre H, Duparc H, Chartrel N, Jegou S, Pellerin A et Laquerriere A (2003) *Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 3 035 – 3 042.

Lehoux JG, Fleury A et Ducharme L (1998) *The acute and chronic effects of adrenocorticotropin on the levels of messenger ribonucleic acid and protein of steroidogenic enzymes in rat adrenal in vivo*. Endocrinology 139 : 3 913 – 1 922.

Lenard A (1951) *The history of research on the adrenals : 1563 – 1900*. Journal of the History of medicine and allied sciences 6 : 496 – 505.

Letovsky J et Dynan WS (1989) *Measurement of the binding of transcription factor Sp1 to a single recognition sequence*. Nucleic Acids Research 17 : 2 639 – 2 653.

Levine M et Hoey T (1988) *Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors*. Cell 55 : 537 – 540.

Levine MA (1999) *Clinical implications of genetic defects in G proteins : oncogene mutations in $G_{\alpha s}$ as the molecular basis for the McCune-Albright syndrome*. Archive of Medical Research 30 : 522 – 531.

Lewin B (1991) *Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors*. Cell 64 : 303 – 312.

Lewis J et Bird A (1991) *DNA methylation and chromatin structure*. FEBS letters 285 : 155 – 159.

Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF et Kieffer TJ (2000) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rat : demonstration by a receptor antagonist*. Endocrinology 141 : 3 710 – 3 716.

Libè R, Groussin L, Tissier F, Elie C, René-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C et Bertherat J (2007) *Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity*. Clinical cancer research 13 : 844 – 850.

Liddle GW, Nicholson WE et Isalnd DP (1969) *Clinical and laboratory studies of ectopic humoral syndromes*. Recent Progress in Hormonal Research 25 : 283 – 314.

Liebmann C (2001) *Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signaling pathway : paradigms of multiplicity*. Cell Signaling 13 : 777 – 785.

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S et Lalouel JM (1992) *A chimaeric 11 β -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension*. Nature 355 : 262 – 265.

Light K, Jenkins PJ, Weber A, Perret C, Grossman A, Pistorello M, Asa SL, Clayton RN et Clark AJ. (1995) *Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia ?* Life Sciences 56 : 1 523 – 1 527.

Lin SR (1994) *Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 78 : 483 – 491.

Lin SY, Black AR, Kostic D, Pajovic S, Hoover CN et Azizkhan JC (1996) *Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction*. Molecular and Cellular Biology 16 : 1 668 – 1 675.

Lin SR, Tsai JH, Yang YC et Lee SC. (1998) *Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumors in Taiwan*. British Journal of Cancer 77 : 1 060 – 1 065.

Liou LS et Kay R (2000) *Adrenocortical carcinoma in children : review and recent innovations*. The Urologic Clinics of North America 27 : 403 - 421.

Liu JH, Kazer RR et Rasmussen DD (1987) *Characterization of the twenty-four hour secretion patterns of adrenocorticotropin and cortisol in normal woman and patients with Cushing's disease*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 64 : 1 027 - 1035.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P et James Darnell (1997) *Biologie moléculaire de la cellule*. DeBoeck Université, 3^e édition, 1 344 pages.

Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H et Lefebvre H (2006) *Expression of serotonin 7 receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 91 : 4 578 – 4 586.

Loweth AC, Scarpello JH et Morgan NG (1995) *Phospholipase A2 expression in human and rodent insulin-secreting cells*. Molecular and Cellular Endocrinology 112 : 177 – 183.

Lu M, Wheeler MB, Leng XH et Boyd AE (1993) *The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagons-like peptide I (7 - 37)*. Endocrinology 132 : 94 – 100.

Luton JP, Bertherat J, Kuhn JM et Bertagna X (1998) *Aberrant expression of the GIP (gastric inhibitory polypeptide) receptor in an adrenal cortical adenoma responsible for a case of food-dependent Cushing's syndrome*. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine 182 : 1 839 – 1 850.

Lynn FC, Pamir N, Ng, EHC, McIntosh CHS, Kieffer, TJ et Pederson RA (2001) *Defective glucose-dependant insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats*. Diabetes 50 : 1 004 – 1 011.

Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, Ehses JA, Hinke SA, Pamir N, McIntosh CHS et Pederson RA (2003) *A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in β -cells*. The FASEB Journal 17 : 91 - 93.

Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, Duh QY, Clarke OH, Kawasaki E et Bourne HR (1990) *Two G protein oncogenes in human endocrine tumors*. Science 249 : 655 – 659.

Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W et Huang XY (2000) *Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins*. Cell 102 : 635 – 646.

MacDonald PE et Wheeler MB (2003) *Voltage – dependent $k(+) channels in pancreatic beta cells : role, regulation and potential as therapeutic targets$* . Diabetologia 46 : 1 046 – 1 062.

Mader S, Kumar V, de Verneuil H et Chambon P (1989) *Three amino acids of the oestrogenreceptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element*. Nature 338 : 271 – 274

Maher ER et Reik W (2000) *Beckwith-Wiedemann syndrome : imprinting in clusters revisited*. The journal of clinical investigation 105 : 247 – 252.

Makino S, HashimotoK, Sugiyama M, Hirasawa R, Takao T et Ota Z (1989) *Cushing's syndrome due to huge nodular adrenocortical hyperplasia with fluctuation of urinary 17-OHCS excretion*. Endocrinologia Japonica 36 : 655 – 663.

Malchoff CD, Orth DN et Abboud JA (1988) *Ectopic ACTH syndrome caused by a bronchial carcinoid tumor responsive to dexamethasone, metyrapone, and corticotrophin-releasing factor*. American Journal of Medicine 84 : 760 - 764.

Maletti M, Altman JJ, Hoa DH, Carlquist M et Rosselin G (1987) *Evidence of functional gastric inhibitory polypeptide receptor in human insulinoma : binding of synthetic human GIP 1-31 and activation of adenylate cyclase*. Diabetes 36 : 1 336 – 1 340.

Maletti M, Portha B, Carlquist M, Kergoat M, Laburthe M, Marie JC et Rosselin G (1984) *Evidence for and characterization of specific high affinity binding sites for the gastric inhibitory polypeptide in pancreatic β -cells*. Endocrinology 115 : 1 324 – 1 331.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ et Tainsky MA (1990) *Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms*. Science 250 : 1233 – 1238.

Mannelli M, Ferruzzi P et Luciani P (2003) *Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an in vivo and in vitro study*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 4 616 – 4 622.

Mahoudeau J et Reznik Y (1993) *L'appétit vient en mangeant, le cortisol aussi : une nouvelle cause de syndrome de Cushing*. Presse médicale 22 : 407 – 409.

Malchoff CD, Rosa J, DeBold CR (1989) *Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular hyperplasia : an unusual cause of Cushing's syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 68 : 855 – 860.

Mancilly GS, Greig N, Tildesley H, Habener J, Egan JM et Elahi D (2003) *Effects of 3 months of continuous subcutaneous administration of glucagon-like peptide 1 in elderly patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care 26 : 2 835 – 2 841.

Marchesa P, Fazio VW, Church JM et McGannon E (1997) *Adrenal masses in patients with familial adenomatous polyposis*. Diseases of the Colon and Rectum 40 : 1 023 – 1 028.

Marieb EN (1999) *Anatomie et physiologie humaine*. Éditions du Renouveau Pédagogique, 2^e édition, Ville Saint-Laurent (Qc) 1194 pages.

Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F et Philipsen S (1997) *Transcription factor Spl is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation*. Cell 89 : 619 - 628.

Marinissen MJ et Gutkind JS (2001) *G-protein-coupled receptors and signalling networks : emerging paradigms*. Trends in Pharmacological Sciences 22 : 368 – 376.

Masters SB, Miller RT, Chi MH, Chang FH, Beiderman B, Lopez NG et Bourne HR (1989) *Mutations in the GTP-binding site of G_s alpha alter stimulation of adenylate cyclase*. Journal of Biological Chemistry 264 : 15 467 – 15474

Matsukura S, Kakita T et Hirata Y (1977) *Adenylate cyclase of GH and ACTH producing tumors of human : activation by non-specific hormones and bioactive substances*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 44 : 392 – 397.

Matsukura S, Kakita T, Sueoka S, Yoshimi H, Hirata Y, Yokota M et Fujita T (1980) *Multiple hormone receptors in the adenylate cyclase of human adrenocortical tumors*. Cancer Research 40 : 3 768 – 3 771.

Matsukura S, Kakita T, Fukase M et Fujita T (1981) *Adenylate cyclase of a human medullary thyroid carcinoma*. Experientia 37 : 523 – 524.

Matyakhina L, Freedman RJ et Bourdeau I (2005) *Hereditary leiomyomatosis associated with bilateral, massive, macronodular adrenocortical disease and atypical Cushing's syndrome : a clinical and molecular genetic investigation*. Journal of Endocrinology and Metabolism 90 : 3 773 – 3 779.

Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, Miller WE, Ahn S, Daaka Y, Lefkowitz RJ et Luttrell LM (2000) *The beta (2) – adrenergic receptor mediates extracellular signal-regulated kinase activation via assembly of a multi-receptor complex with the epidermal growth factor receptor*. Journal of Biological Chemistry 275 : 9 572 – 9 580.

Mauras N et Blizzard RM (1986) *The McCune-Albright syndrome*. Acta Endocrinologica Supplementum 279 : 207 – 217.

Maxwell V, Shulkes A, Brown JC, Solomon TE, Walsh JH et Grossman MI (1980) *Effect of gastric inhibitory polypeptide on pentagastrin-stimulated acid secretion in man*. Digestive Diseases and Science 25 : 113 – 116.

Mazzocchi, G, Rebuffat, P, Meneghelli, V, Malendowicz, LK, Tortorella, C, ottardo, G et Nussdorfer, GG (1992) *Gastric inhibitory polypeptide stimulates glucocorticoid secretion in rats, acting through specific receptors coupled with adenylate cyclase-dependant signalling pathway*. Peptides 20 : 589 – 594.

Mazuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ et Thomas M (2006) *Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model*. Endocrinology 147 : 782 – 790.

Mazuco TL, Chabre O, Feige JJ et Thomas M (2006) *Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 91 : 196 – 203.

Mazzucco TL, Chabre O, Feige JJ et Thomas M (2007) *Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis*. Molecular and Cellular Endocrinology 23 : 265 - 266.

McCuaig KA, Lee HS, Clarke JC, Assar H, Horsford J et White JH (1995) *Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissu-specific and ubiquitous promoters*. Nucleic Acids Research 23 : 1948 – 1955.

McCune DJ et Brunch H (1937) *Osteodystrophia fibrosa*.

McIntosh CHS, Wheeler MB, Gelling RW, Brown JC et Pederson RA (1996) *GIP receptors and signal-transduction mechanisms*. Acta Physiologica Scandinavica 157 : 361 – 365.

McIntosh CHS, Bremsak I, Lynn FC, Gill R, Hinke SA, Gelling R, Nian C, McKnight G, Jaspers S, Pederson RA (1999) *Glucose-dependant insulinotropic polypeptide stimulation of lipolysis in differentiated 3T3-L1 cells : wortmannin-sensitive inhibition by insulin*. Endocrinology 140 : 398 – 404.

McIntyre N, Holdsworth CD et Turner DS (1964) *New interpretation of oral glucose tolerance*. Lancet 2 : 20 – 21.

Means A et Farnham P (1990) *Transcription initiation from the dihydrofolate reductase promoter is positioned by HIP1 binding at the initiation site*. Molecular and Cellular Biology 10 : 653 – 661.

Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL et Bird AP (1989) *Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpG*. Cell 58 : 499 – 507.

Meier JJ, Hücking K, Holst JJ, Deacon CF, Schmiegel WH et Nauck MA (2001) *Reduced insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in first-degree relatives of patients with type 2 diabetes*. Diabetes 50 : 2 497 – 2 504.

Meinard JR, Wolffenbittel BH et Dullaart RP (2007) *Cyclic Cushing's syndrome : a clinical challenge*. European Journal of Endocrinology 157 : 245 – 254.

Meisterernst M (2002) *Mediator meets Morpheus*. Science 295 : 984 – 985.

Mentlein R, Gallwitz B et Schmidt WE (1993) *Dipeptidyl peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagons-like peptide 1 [7-36] amide, peptide histidine methionine, and is responsible for their degradation in human serum*. European Journal of Biochemistry 214 : 829 – 835.

Mentlein R (1999) *Dipeptidyl-dipeptidase IV role in the inactivation of regulatory peptide*. Regulatory Peptide 85 : 9 – 24.

Merchant JL, Du M et Todisco A (1999) *Spl phosphorylation by Erk 2 stimulates DNA binding*. Biochemical and Biophysical Research Communication 254 : 454 – 461.

Mermod N, O'Neill EA, Kelly TJ et Tjian R (1989) *The praline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain*. Cell 58 : 741 – 753.

Mesiano S et Jaffe RB (1997) *Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex*. Endocrine Reviews 18 : 378 – 403.

Miki T, Minami K, Shinozaki H, Matsumura K, Sarraf A, Ikeda H, Yamada Y, Holst JJ et Seino S (2005) *Distinct effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagons-like peptide-1 on insulin secretion and gut motility*. Diabetes 54 : 1 056 – 1 063.

Millington DS, Golder MPCowley T, London D, Roberts H, Butt WR et Griffiths K (1976) *In vitro synthesis of steroids by a feminizing adrenocortical carcinoma : effect of prolactin and other protein hormone*. Acta Endocrinologica 82 : 561 – 571.

Minami S, Sugihara H et Sato J (1996) *ACTH-independent Cushing's syndrome occurring in siblings*. Clinical Endocrinology 44 : 483 – 488.

Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N et Lacroix A (2000) *Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome ?* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85 : 3 531 – 3 536.

Mitchell PJ et Tjian R (1989) *Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins*. Science 245 : 371 – 378.

Miura Y, Kato M, Ogino K et Matsui H (1997) *Impaired cytosolic Ca²⁺ response to glucose and gastric inhibitory polypeptide in pancreatic beta-cells from triphenyltin-induced diabetic hamster*. Endocrinology 138 : 2 769 – 2 775.

Miyamura N, Taguchi T et Murata Y (2002) *Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines : detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland*. Endocrine 19 : 319 – 326.

Miyamura N, Tsutsumi A et Senokuchi H (2003) *A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia : simultaneous expression of several aberrant hormone receptors in the adrenal gland*. Endocrine Journal 50 : 333 – 340.

Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, Kubota A, Fujimoto S., Kajikawa M, Kuroe A, Tsuda K, Hashimoto H, Yamashita T, Jomori T, Tashiro F, Miyazaki J et Seino Y (1999) *Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis : a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 96 : 14 843 – 14 847.

Moens K, Heimberg H, Flamez D, Huypens P, Quartier E, Ling Z, Pipeleers D, Gremlich S, Thorens B et Schuit F (1996) *Expression and functional activity of glucagons, glucagons-like peptide I, and Glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells*. Diabetes 45 : 257 – 261.

Mojsov S, Heinrich G, Wilson IB, Ravazzola M, Orci L et Habener JF (1986) *Preproglucagon gene expression in pancreas and intestine diversifies at the level of post-translational processing*. Journal of Biological Chemistry 261 : 11 880 – 11 889.

Mojsov S, Weir GC et Habener JF (1987) *Insulinotropin : glucagons-like peptide 1 (7-37) co-encoded in the glucagons gene is a potent stimulator of insulin released in the perfused rat pancreas*. Journal of Clinical Investigation 79 : 616 – 619.

Monkhouse WS et Khalique A (1986) *The adrenal and renal veins of man and their connections with azygos and lumbar veins*. Journal of Anatomy 146 : 105 - 115.

Montrose-Rafizadah C, Avdonin P, Garant MJ, Rodgers BD, Kole S, Yang H, Levine MA, Schwinndinger W et Bernier M (1999) *Pancreatic GLP-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathway in Chinese hamster ovary cells*. *Endocrinology* 140 : 1 132 – 1 140.

Moody A, Thim L et Valverde I (1984) *The isolation and sequencing of human gastric inhibitory polypeptide (GIP)*. *FEBS Letters* 172 : 142 – 148.

Morgan LM (1996) *The metabolic role of GIP : physiology and pathology*. *Biochemical Society Transactions* 24 : 585 – 594.

Morioka M, Ohashi Y, Watanabe H, Komatsu F, Jin TX, Suyama B et Tanaka H. (1997) *ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) : report of two cases and the analysis of steroidogenic activity in adrenal nodules*. *Endocrine Journal* 44 : 65 – 72.

Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT et Cone RD (1992) *The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors*. *Science* 257 : 1 248 – 1 251.

Mukherjee AB, Miele L et Pattabiraman N (1994) *Phospholipase A2 enzymes : regulation and physiological role*. *Biochemical Pharmacology* 48 : 1 – 10.

Mune T, Murase H et Yamakita N (2002) *Eutopic overexpression of vasopressin V1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 : 5 706 – 5 713.

Murakami M, Kudo I, Suwa Y et Inoue K (1992) *Release of 14-kDa group-II phospholipase A2 from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of the degranulation process*. *European Journal of Biochemistry* 209 : 257 – 265.

Murata Y, Kim HG, Rogers KT, Udvadia AJ et Horowitz JM (1994) *Negative regulation of Sp1 trans-activation is correlated with the binding of cellular protein to the amino-terminus of the Sp1 trans-activation domain*. *Journal of Biological chemistry* 269 : 20 674 – 20 681.

Näär AM, Taatjes DJ, Zhai W, Nogales E et Tjian R (2002) *Human CRSP interacts with RNA polymerase II CTD and adopts a specific CTD-bound conformation*. *Genes and Development* 16 : 1 339 – 1 344.

Nakamura Y, Son Y et Kohno Y (2001) *Case of adrenocorticotrophic hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II*. *Endocrine* 15 : 57 – 61.

Nakao Y, Tsuruzawa M et Kanaoka H (1975) *Cushing's syndrome caused by ACTH-producing carcinoid tumor originating in the duodenum*. *Hormon To Rinsho* 23 : 603 – 607.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenmans RN et Bird A (1998) *Transcriptional repression by the methyl CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. *Nature* 393 : 386 – 389.

Nauck M, Stockmann F, Ebert R et Creutzfeldt W (1986) *Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes*. *Diabetologia* 29 : 46 – 52.

Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R et Creutzfeldt W (1992) *Lack of effect of synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagons-like peptide 1 [3-36] amide on gastric acid secretion in normal human subjects*. *Digestion* 52 : 214 – 221.

Nauck MA, Kleine N, Orsov C, Holst JJ, Willms B et Creutzfeldt W (1993) *Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagons-like peptide-1 (7 – 36) amide in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients*. Diabetologia 36 : 741 – 744.

Nauck M, Creutzfeldt W, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ et Ebert H (1993) *Preserved incretin activity of glucagons-like peptide 1 [7-36 amide] but not synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus*. Journal of Clinical Investigation 91 : 301 – 307.

Nauck MA, Wollschlager D, Werner J, Holst JJ, Orskov C et Creutzfeldt W (1996) *Effects of subcutaneous glucagons-like peptide 1 (GLP-1) [7-36] amide in patients with NIDDM*. Diabetologia 39 : 1 546 – 1 553.

Nauck MA (1997) *Glucagon-like peptide 1*. Current Opinion in Endocrinol Diabetes 4 : 256 – 261.

Nauck MA, Holst JJ et Willms B (1997) *Glucagon-like peptide 1 and its potential in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Hormone and Metabolism Research 293 : 411 – 416.

Nauck MA (1999) *Is glucagons-like peptide 1 an incretin hormone ?* Diabetologia 42 : 371 – 379.

Nauck MA, Baller B et Meier JJ (2004) *Gastric inhibitory polypeptide and glucagons-like peptide-1 in the pathogenesis of type 2 diabetes*. Diabetes 53 : S190 – S196.

Naville D, Jaillard C, Barjhoux L, Durand P et Bégeot M (1997) *Genomic structure and promoter characterization of the human ACTH receptor gene*. Biochemical and Biophysical Research Communication 230 : 7 – 12.

N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, DeHerder WW et Lacroix A (1998) *Adrenocortical Overexpression of Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor Underlies Food-dependant Cushing's Syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83 : 2 781 –2 785.

N'Diaye N, Hamet P, Tremblay J, Boutin JM, Gaboury L et Lacroix A (1999) *Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependant Cushing's Syndrome*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 84 : 2 616 –2 622.

Newell-Price J, King P et Clark AJL (2000) *DNA methylation and silencing of gene expression*. TRENDS in Endocrinology and metabolism 11 : 123 – 162.

Newell-Price J, King P et Clark AJL (2001) *The CpG island promoter of the human proopiomelanocortin gene is methylated in nonexpressing normal tissue and tumors and represses expression*. Molecular Endocrinology 15 : 338 – 348.

Newell-Price J (2003) *Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation : implications for Cushing's syndrome and beyond*. Journal of Endocrinology 177 : 365 – 372.

NG L et Libertino JM (2003) *Adrenocortical carcinoma : Diagnosis, evaluation and treatment*. The Journal of Urology 169 : 5 – 11.

Nies C, Bartsch DK et Ehlenz K (2002) *Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only femal family members*. Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes, 110 : 277 – 283.

Nishiguchi Y, Kamino K et Sakazaki S, Hashimoto H, Sowa M, Umeyama K et Mitsuhashi T. (1987) A case of carcinoid of the duodenum with carcinoma of the stomach Gan No Rinsho 33 : 841 – 847.

Noordam C, Hermus ARMM, Pesman G, N'Diaye N, Sweep CGJ, Lacroix A e Otten BJ (2002) *An adolescent with food-dependent Cushing's syndrome secondary to ectopic expression of GIP receptor in unilateral adrenal adenoma.* Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 15 : 853 – 860.

Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R et Grosveld F (1995) *Defective hematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene.* Nature 375 : 316 – 318.

NussDorfer CG (1986) *Cytophysiology of the adrenal cortex.* International Reviews of Cytology 98 : 211 – 249.

Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn AM, Strom AK, Brederlau A, Illerskog AC, Nilsson O, Kieffer TJ et Hietala MA (2005) *Glucose-dependent insulintropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation.* Journal of Neurosciences 25 : 1 816 – 1 825.

Oben J, Morgan LM, Fletcher J et Marks V (1991) *Effect of the entero-pancreatic hormones gastric inhibitory polypeptide and glucagons-like peptide 1 [7-36] amide on fatty acids synthesis in explants of rat adipose tissue.* Journal of Endocrinology 130 : 267 – 272.

O'Harte FP. Gray AM et Flatt PR (1998) *Gastric inhibitory polypeptide and effect of glycation on glucose transport an metabolism in isolated mouse abdominal muscle.* Journal of Endocrinology 156 : 237 – 243.

Ohmstede CA, Farrell FX, Reep BR, Clemetson KJ et Lapetina EG (1990) *RAP2B : a RAS-related GTP-binding protein from platelets.* Proceeding of the National Academy of Sciences 87 : 6 527 – 6 531.

Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD et Sakai T (1993) *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor supressor gene.* Oncogene 8 : 1 063 – 1 068.

Okazaki T, Ando K, Igarashi T, Ogata E et Fujita T (1992) *Conserved mechanism of negative gene regulation by extracellular calcium.* Journal of Clinical Investigation, 89 : 1268 – 1273.

Okasaki T, Chung U, Nishishita T, Ebisu S, Usuda S, Mishiro S, Xanthoudakis S, Igarashi T et Ogata E (1994) *A redox factor protein, Ref-1, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium.* Journal of Biological Chemistry 269 : 27 855 – 27 862.

Orphanides G, Lagrange T et Reinberg D (1996) *The general transcription factors of RNA polymerase II.* Genes and Development 10 : 2 657 – 2 683.

Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S, Baldissera FG, Poulsen SS et Nielsen OV (1986) *Glucagon-like peptide GLP-1 et GLP-2, predicted products of the glucagons gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas.* Endocrinology 119 : 1 467 – 1 475.

Orskov C, Vilsboll T, Krarup T, Inagaki N et Hjorth SA (1999) *Lack of germ-line mutations in the GIP-coding region of the pro-GIP in type 2 diabetic patients.* Diabetes 48, suppl 1 : S56.

Orth DN (1987) *Ectopic hormone production*. Endocrinology and Metabolism, 2^e editions, Felig P, Baxter JD, Broadus AE et Frohman LA, McGraw-Hill, New-York, 1692 pages.

Orth DN (1995) *Cushing's syndrome*. New England Journal of Medicine 332 : 791 – 803.

O'Sullivan C, Barton CM, Staddon SL, Brown CL et Lemoine NR (1991) *Activating point mutations of the gsp oncogene in human thyroid adenomas*. Molecular Carcinogenesis 4 : 345 – 349.

Pabon JE, Li X, Lei ZM, Sanfilippo JS, Yussman MA et Rao CV (1996) *Novel presence of luteinizing hormone / chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81 : 2 397 – 2 400.

PaonessaG, Gounari F, Frank R et Cortese R (1988) *Purification of a NF-I-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA*. EMBO Journal 7 : 3 115 – 3 123.

Parks CL et Shenk T (1996) *The serotonin 1a receptor gene contains a TATA-less promoter that responds to MAZ and Sp1*. The Journal of Biological Chemistry 271 : 4 417 – 4 430.

Parma J, Duprey L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mochal J, Dumont JE et Vassart G (1993) *Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas*. Nature 365 : 649 – 651.

Pascal B et Tjian R (1991) *Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism*. Genes and Development 5 : 1 646 – 1 656.

Pascual-Le Tallec L, Dulmet E, Bertagna X et De Keyzer Y (2002) *Identification of genes associated with the corticotroph phenotype in bronchial carcinoid tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 87 : 5 015 - 5022.

Pearson G, Robinson F, Beers-Gibson I, Xu BE, Karandikar M, Merman K et Cobb MH (2001) *Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways : regulation and physiological functions*. Endocrine Review 22 : 153 – 183.

Pederson RA, Schubert HE et Brown JC (1975) *GIP : its physiological release and insulinotropic action*. Diabetes 24 : 1 050 – 1 056.

Pederson RA et Brown JC (1976) *The insulinotropic action of GIP in the perfused isolated rat pancreas*. Endocrinology 99 : 780 – 785.

Pederson RA, Schubert HE et Brown JC (1975) *The insulinotropic action of gastric inhibitory polypeptide*. Canadian Journal of Physiology & Pharmacology 53 : 217 – 223.

Pederson RA, Schubert HE et Brown JC (1975) *Gastric inhibitory polypeptide : Its physiological release and insulinotropic action in the dog*. Diabetes 24 : 1 050 – 1 056.

Pederson RA, Satkunarajah M, McIntosh CHS, Scrocchi LA, Flamez D, Schuit F, Drucker DJ et Wheeler MB (1998) *Enhanced glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion and insulinotropic action in glucagons-like peptide 1 receptor (-/-) mice*. Diabetes 47 : 1 046 – 1 052.

Pepe GJ et Albrecht ED (1990) *Regulation of the primate fetal adrenal cortex*. Endocrine Review 11 : 151 - 176.

- Perchellet JP et Sharma RK (1980) *Ectopic alpha-adrenergic mediated accumulation of guanosine 3', 5'-monophosphate in isolated adrenocortical carcinoma cells*. Endocrinology 106 : 1589 – 1593.
- Perkins AC, Sharpe AH et Orkin SH (1995) *Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factors EKLF*. Nature 375 : 318 – 322.
- Perraudin V, Delarue C et de Keyzer Y (1995) *Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome : in vivo and in vitro studies*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80 : 2 661 – 2 667.
- Philipsen S et Suske G (1999) *A tale of three fingers : the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors*. Nucleic Acids Research 27 : 2 991 – 3000.
- Pilon C, Pistorello M et Moscon A (1999) *Inactivation of the p16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors*. Journal of Clinical Endocrinology and metabolism 84 : 2 776 - 2779.
- Piltonen T, Koivunen R, Morin-Papunen L, Ruokonen A, Huhtaniemi IT et Tapanainen JS (2002) *Ovarian and adrenal steroid production : regulatory role of LH / hCG*. Human Reproduction 17 : 620 – 624.
- Pittaway DE, Andersen RN et Givens JR (1973) *In vitro on an HCG responsive, testosterone secreting adrenal cortical adenoma*. Steroids 22 : 731 – 745.
- Plasthne M (1988) *How eukaryotic transcriptional activators work*. Nature 335 : 683 – 689.
- Polak JM, Bloom SR, Kuzio M, Brown JC et Pearse AGE (1973) *Cellular localization of gastric inhibitory polypeptide in the duodenum and jejunum*. Gut 14 : 284 – 288.
- Pralong FP, Gomez F, Guillou L, Mosimann F, Franscella S et Gaillard RC (1999) *Food-dependent Cushing's syndrome : possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 84 : 3 817 – 3 822.
- Preitner F, Ibberson M, Franklin I, Binnert C, Pende M, Gjinovci A, Hansotia T, Drucker DJ, Wollheim C, Burcelin R et Thorens B (2004) *Glucagon-like peptide 1 control insulin secretion at multiple levels as revealed in mice lacking GLP-1 and GIP receptors*. Journal of Clinical Investigation 113 : 635 – 645.
- Pugh BF et Tjian R (1990) *Mechanism of transcriptional activation by Sp1 : evidence for coactivators*. Cell 61 : 1 187 – 1 197.
- Qualmann C, Nauck MA, Holst JJ, Orskov C et Creutzfeldt W (1995) *Insulinotropic action of intravenous glucagon-like peptide 1 (GLP-1) [7-36] amide in the fasting state in healthy subject*. Acta Diabetologica 32 : 13 – 26.
- Quddusi S, Browne P, Toivola B et Hirsch IB (1998) *Cushing's syndrome due to surreptitious glucocorticoid administration*. Archives of Internal Medicine 158 : 294 - 296.
- Rachman J, Barrow BA, Levy JC et Turner RC (1997) *Near-normalisation of diurnal glucose concentrations by continuous administration of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in subjects with NIDDM*. Diabetologia 40 : 205 – 211.
- Ramanadham S, Gross RW, Han X et Turk J (1993) *Inhibition of arachidonate release by secretagogue-stimulated pancreatic islets suppresses both insulin secretion and the rise in beta-cell cytosolic calcium ion concentration*. Biochemistry 32 : 337 – 346.

Ramanadham S, Ma Z, Arita H, Zhang S et Turk J (1998) *Type IB secretory phospholipase A2 is contained in insulin secretory granules of pancreatic islet beta-cells and is co-secreted with insulin from glucose-stimulated islets*. Biochemica and Biophysica Acta 1390 : 310- 312.

Raux-Demay MC et Girard F (1993) *Syndrome de Cushing de l'enfant*. Annale de pédiatrie 40 : 453 – 462.

Reincke M, Karl M et Travis WH (1994) *p53 mutations in human adrenocortical neoplasms : immunohistochemical and molecular studies*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 78 : 790 – 794.

Reincke M, Beuschlein F, Latronico AC, Arlt W, Chrousos GP et Allolio B (1997) *Expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in human adrenocortical neoplasms : correlation with P450scc expression*. Clinical Endocrinology 46 : 619 – 626.

Reincke M (1998) *Mutations in adrenocortical tumors*. Hormone and Metabolism Research 30 : 447 – 455.

Reznik Y, Allari-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Ballière AM et Mahoudeau J (1992) *Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide*. New England Journal of Medicine 327 : 981 – 986.

Richards JS (2001) *New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate action in endocrine cells*. Molecular Endocrinology 15 : 209 – 218.

Riggs AD et Pfeifer GP (1992) *X-chromosome inactivation and cell memory*. TRENDS in Genetic 8 : 169 – 174.

Roduit R, Morin J, Massé F, Segall L, Roche E, Newgard CB, Assimacopoulos-Jeannet F et Prentki M (2000) *Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene in pancreatic β -cell*. Journal of Biological Chemistry 275 : 35 799 – 35 806.

Roeder RG (1996) *The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II*. Trends in biochemical sciences 21 : 327 – 335.

Rohlf C, Ahmad S, Borelloni F, Lei J et Glazer RI (1997) *Modulation of transcription factor by cAMP-dependent protein kinase*. Journal of Biological Chemistry 272 : 21 137 – 21 141.

Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J et Glazer R (1997) *Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase*. The Journal of Biological Chemistry 272 : 21 137 – 21 141.

Roos MD, Su K, Baker JR et Kudlow JE (1997) *O-glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions*. Molecular and Cellular Biology 17 : 6 472 – 6480.

Rosenberg CL, Kim HG, Shows TB, Kronenberg HM et Arnold A (1991) *Rearrangement and overexpression of D11S287E, a candidate oncogene on chromosome 11q13 in benign parathyroid tumors*. Oncogene 6 : 449 – 453.

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X et Bertherat J (2002) *Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues*. Annals of New-York Academy of Sciences 968 : 65 – 74.

Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemonne K, Medjane S, Louvel A, Bertagna X et Bertherat J (2003) *Transcription factor 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development*. The journal of clinical endocrinology and metabolism 88 : 3958 – 3965.

Ross SA, Brown JC et Dupré J (1977) *Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide following oral glucose in diabetes mellitus*. Diabetes 26 : 525 – 529.

Ross NS (1994) *Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease*. Endocrinology and Metabolism Clinical North America 23 : 539 – 546.

Rupert GC et Wolfe MM (2000) *GIP Biology and Fat Metabolism*. Life Science 66 : 91 – 103.

Ryu S, Zhou S, Ladurner AG et Tjian R (1999) *The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer binding protein Sp1*. Nature 397 : 446 – 450.

Saez JM, Dazord A et Gallet D (1975) *ACTH and prostaglandin receptors in human adrenocortical tumors*. Journal of Clinical Investigation 56 : 536 – 547.

Saffer JD, Jackson SP et Thurston SJ (1990) *SV40 stimulates expression of the transacting factor Sp1 at the mRNA level*. Genes and Development 4 : 659 – 666.

Saffer JD, Jackson SP et Annarella MB (1991) *Developmental expression of Sp1 in the mouse*. Molecular and Cellular Biology 11 : 2 189 – 2 199.

Sakai DD, Helms S, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM et Yamamoto KR (1988) *Hormone-mediated repression : a negative glucocorticoid response element from the bovine prolactin gene*. Gene Development 2 : 1 144 – 1 154.

Salera M, Giacomoni P, Pironi L, Cornia G, Capelli M, Marini A, Benfenati F, Miglioli M et Barbara L (1982) *Gastric inhibitory polypeptide release after oral glucose : relationship to glucose intolerance, diabetes mellitus, and obesity*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 53 : 329 – 336.

Salowsky R, Heiss NS, Benner A, Wittig R et Poustka A (2002) *Basal transcription activity of the dyskeratosis congenital gene is mediated by Sp1 and Sp3 and a patient mutation in a Sp1 binding site is associate with decreased promoter activity*. Gene 293 : 9 – 19.

Samson SLA et Wong NCW (2002) *Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression*. Journal of Molecular Endocrinology 29 : 265 – 279.

Sasaki H, Ishihara K et Kato R (2000) *Mechanisms of IGF-2/H19 imprinting : DNA methylation, chromatin and long-distance gene regulation*. Journal of Biochemistry 127 : 711 – 715.

Sasano H, Suzuki T et Nagura H (1994) *ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia : immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes*. Modern Pathology 7 : 215 – 219.

Sasano H (1994) *Localization of steroidogenic enzymes in adrenal cortex and its disorders*. Endocrine Journal 41 : 471 – 482.

Saurez HG, du Villard JA, Caillou B, Schumberger M, Parmentier C et Monier R (1991) *gsp mutations in human thyroid tumors*. Oncogene 6 : 677 – 679.

Savage MO et Besser GM (1996) *Cushing's disease in childhood*. Trends in Endocrinology and Metabolism 7 : 213 – 216.

Schäfer D, Hamm-Künzelmann et Brand K (1997) *Glucose regulates the promoter activity of aldolase A and pyruvate kinase M₂ via dephosphorylation of Sp1*. FEBS Letters 417 : 325 – 328.

Schaufele F, West B et Reudelhuber TI (1990) *Overlapping Pit-1 and Sp1 binding sites are both essential to full rat growth hormone gene promoter activity despite mutually exclusive Pit-1 and Sp1 binding*. Journal of Biological Chemistry 265 : 17 189 – 17196.

Scheidereit C, Cromlish JA, Gerster T, Kawakami K, Balmaceda CG, Currie RA et Roeder RG (1988) *A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homeobox protein*. Nature 336 : 551 – 557.

Schorr I et Ney RL (1971) *Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase*. Journal of Clinical Investigation 50 : 1 295 – 1 300.

Schorr I, Rathnam P, Saxena BB et Ney RL (1971) *Multiple specific hormone receptors in the adenylate cyclase of an adrenocortical carcinoma*. Journal of Biological Chemistry 246 : 5 806 – 5 811.

Schorr I, Hinshaw HT, Cooper MA, Mahaffee D et Ney LR (1972) *Adenylate cyclase hormone responses of certain human endocrine tumors*. Journal of Clinical Endocrinology 34 : 447 – 451.

Scott MP, Tamkun JW et Hartzell WH (1989) *The structure and function of the homeodomain*. Biochemica and Biophysica Acta 989 : 25 – 48.

Scrocchi LA, Brown TJ, Maclusky N, Brubaker PL, Auerbach AB, Joyner AL et Drucker DJ (1996) *Glucose intolerance but normal satiety in mice with null mutation in the glucagons-like peptide 1 receptor gene*. Nature Medicine 2 : 1 254 – 1 258.

Sederberg-Olsen P, Binder C et Kehlet H (1973) *Episodic variation in plasma corticosteroids in subjects with Cushing's syndrome of differing etiology*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 36 : 906 - 910.

Segaloff DL et Ascoli M (1993) *The lutropin/choriogonadotropin receptor ... 4 years later*. Endocrine Review 14 : 324 – 347.

Seron-Ferre M, Lawrence CC et Jaffe RB (1978) *Role of hCG in regulation of the fetal zone of the human fetal adrenal gland*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 46 : 834 – 837.

Seto E, Lewis B et Shenk T (1993) *Interaction between transcription factors Sp1 and YY1*. Nature 365 : 462 – 464.

Sewer MB et Waterman MR (2002) *c-AMP-dependent transcription of steroidogenic genes in the human adrenal cortex requires a dual-specificity phosphatase in addition to protein kinase A*. Journal of Molecular Endocrinology 29 : 163 – 174.

Shanker G et Sharma RK (1980) *Characterization of ectopic alpha-adrenergic binding receptors of adrenocortical carcinoma cells*. Endocrinology 106 : 1594 – 1598.

Shenker A, Lane L, Kosugi S, Meredino JJ, Minegiski T et Cutter GB (1993) *A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty*. Nature 365 : 652 – 654.

- Shi Y, Seto E, Chang LS et Shenk T (1991) *Transcriptional repression by YY1, a human GLI-kruppel-related protein and relief of repression by adenovirus E1A protein*. Cell 67 : 377 – 388.
- Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Andi T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I et Saruta T (2001) *Expression profiles of COUP-TF, Dax-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors : possible implications in steroidogenesis*. Molecular Genetic et Metabolism 74 : 206 – 216.
- Shimada J, Suzuki Y, Kim SJ, Wang PC, Matsumura M et Kojima S (2001) *Transactivation via RAR/RXR-Sp1 interaction : characterization of binding between Sp1 and GC box motif*. Molecular Endocrinology 15 : 1 677 – 1 692.
- Siegel EG et Creutzfeldt TW (1985) *Stimulation of insulin release in isolated islets by GIP in physiological concentration and its relation to islet cyclic AMP content*. Diabetologia 28 : 857 – 861.
- Simonsson E et Ahrén B (2000) *Phospholipase A2 and its potential regulation of islet function*. International Journal of Pancreatology 27 : 1 – 11.
- Sjottem E, Anderssen S et Johansen T (1996) *The promoter activity of long terminal repeats of the HERV-H family of human retrovirus-like elements is critically dependent on Sp1 family proteins interacting with a GC/GT box located immediately 3' to the TATA box*. Journal of Virology 70 : 188 – 198.
- Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, Kvanta E, Rastad J, Theodorsson E, Wide L, Wilander E et Oberg K (1992) *Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 75 : 76 – 81.
- Sogawa K, Imataka I, Yamasaki Y, Kusume H, Abe H et Fujii-Kuriyama Y (1993) *cDNA cloning and transcriptional properties of a novel GC box-binding protein, BTEB2*. Nucleic Acids research 21 : 1 527 – 1 532.
- Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC et Goetzl EJ (1995) *Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene*. Proceeding of the National Academy of Sciences USA 92 : 2 939 – 2 943.
- Starich GH, Bar RS et Mazzaferri EL (1985) *GIP increases insulin receptor affinity and cellular sensitivity in adipocytes*. American Journal of Physiology 249 : E603 – E607.
- Storr HL, Isidon AM, Monson JP, Besser MG, Grossman AB et Savage MO (2004) *Prepubertal Cushing's disease is more common in males but there is no increase in severity at diagnosis*. Journal of Clinical Endocrinology 89 : 3 818 – 3 820.
- Stratakis CA et Kirschner LS (1998) *Clinical and genetic analysis of the primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing's syndrome*. Hormone and Metabolism Research 30 : 456 – 463.
- Stratakis CA, Sarlis N et Kirschner LS (1999) *Paradoxical response to dexamethasone in the diagnosis of primary pigmented nodular adrenocortical disease*. Anals of International Medicine 131 : 585 – 591.
- Stratakis CA et Chrousos GP (2000) *Adrenal cancer*. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 29 : 15 – 25.

Stratakis CA, Kirschner LS et Carney JA (2001) *Clinical and molecular features of the Carney complex : diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86 : 4 041 – 4 046.

Stratakis CA (2002) *Mutations of the gene encoding the proteine kinase A type I- α regulatory subunit (PRKARIA) in patients with the complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas (Carney complex)*. Annals of the New-York Academy of Sciences 968 : 3 – 21.

Stratakis CA (2003) *Genetics of adrenocortical tumors : gatekeepers, landscapers, and conductors in symphony*. TRENDS in Endocrinology and Metabolism 14 : 404 – 410.

Straub SG et Sharp GW (1996) *A wortmannin-sensitive signal transduction pathway is involved in the stimulation of insulin release by a vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*. Journal of Biological Chemistry 271 : 1 660 – 1 668.

Straub SG et Sharp GW (1996) *Glucose-dependent insulintropic polypeptide stimulates insulin secretion via increased cyclic AMP and a Ca^{2+} and a wortmannin-sensitive signaling pathway*. Biochemical and Biophysical Research Communication 224 : 369 – 374.

Strott CA, Nugent CA et Tyler FH (1968) *Cushing's syndrome caused by a bronchial adenomas*. American Journal of Medicine 44 : 97 - 104.

Struhl K (1998) *Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms*. Genes et Development 12 : 599 – 606.

Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Ikeda Y, Sato K, Taniyama Y, Ito S et Takeuchi K (2002) *Transcription suppression of thromboxane receptor gene by peroxisome proliferators-activated receptor- γ via an interaction with spl in vascular smooth muscle cells*. Journal of Biological Chemistry 277 : 9 676 – 9 683.

Sugawara T, Sato MK et Itoi K (2002) *Successful localization and treatment for ectopic adrenocorticotrophic hormone secretion in a rare case of possible Tx N2 M0 carcinoid tumor with Cushing's syndrome*. Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 124 : 1 237 – 1 238.

Suske G (1999) *The Sp-family of transcription factors*. Gene 238 : 291 – 300.

Suzuki H, Shibata H, Maruyama T, Ishimura Y et Saruta T (1995) *Significance of steroidogenic enzymes in the pathogenesis of hyperfunctioning and non-hyperfunctioning adrenal tumors*. Steroids 60 : 42 – 47.

Suzuki Y, Shimada J, Shudo K, Matsumura M, Crippa MP et Kojima S (1999) *physical interaction between retinoic acid receptor and spl : mechanism for induction of urokinase by retinoic acid*. Blood 93 : 4 264 – 4 276.

Svensson AM, Efendic S, Ostenson CG et Jansson L (1997) *Gastric inhibitory polypeptide and splanchnic blood perfusion : augmentation of the islet blood flow increase in hyperglycemic rats*. Peptides 18 : 1 055 – 1 059.

Sword FM, Baig A et Malchoff DM (2002) *Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity*. Molecular Endocrinology 16 : 2 746 – 2 753.

Sword FM, Noon LA et King PJ (2004) *Constitutive activation of the human ACTH receptor resulting from a synergistic interaction between two naturally occurring missense mutations in the MC2R gene*. Molecular and Cellular Endocrinology 213 : 149 – 154.

Swords FM, Aylwin S, Perry L, Arola J, Grossman AB, Monson JP et AJL Clark (2005) *The aberrant expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia : does chronic ACTH exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing disease ?* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 90 : 3009 - 3016

Taatjes DJ, Näär AM, Andel F, Nogales E et Tjian R (2002) *Structure, function, and activator-induced conformations of CRSP coactivator.* Science 295 : 1 058 – 1 062.

Tadjine M, Lampron A, Ouadi L et Bourdeau I (2007) *Frequent mutations of the β -catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas.* Clinical Endocrinology

Takeda J, Seino Y, Tanaka K, Fukumoto H, Kayano T, Takahashi H, Mitani T, Kurono M, Suzuki T et Tobe T (1987) *Sequence of an intestinal cDNA encoding human gastric inhibitory polypeptide precursor.* Proceeding of the National Academy of Sciences 84 : 7 005 – 7 008.

Takemura J, Seino Y, Tsuda K, Seino S, Ikeda M, Sakurai H et Imura H (1981) *Hypersecretion of gastric inhibitory polypeptide induced by glucose ingestion in diabetes mellitus.* Endocrinologica Japonica 28 : 17 – 21.

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, eki K, Kaburagi Y et Satoh S (1994) *Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1.* Nature 372 : 182 – 186.

Tanese N, Pugh BF et Tjian R (1991) *Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex.* Genes Development 5 : 2 212 – 2 224.

Tate P, Skarnes W et Bird A (1996) *The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse.* Nature Genetic 12 : 205 – 208.

Thorens B (1992) *Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide-1.* Proceeding of the National Academy of Sciences 89 : 8 641 – 8 645.

Tissier F, Cavard C et Groussin L (2005) *Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors : activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors.* Cancer Research 65 : 7 622 – 7 627.

Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C et Bertherat J (2005) *Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors : activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors.* Cancer Research 65 : 7622 – 7627.

Toft-Nielsen MB, Madsbad S et Holst JJ (1999) *Continuous subcutaneous infusion of glucagons-like peptide 1 lowers plasma glucose and reduces appetite in type 2 diabetic patients.* Diabetes Care 22 : 1 137 – 1 143.

Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, Hilsted LM, Hughes TE, Michelsen BK et Holst JJ (2001) *Determinants of the impaired secretion of the glucagons-like peptide 1 in type 2 diabetic patients.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86 : 3 717 – 3 723.

Trümper A, Trümper K, Trusheim H, Arnold R, Göke B et Hörsch D (2001) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for β (INS-1) cells by pleiotropic signaling.* Molecular Endocrinology 15 : 1 559 – 1 570.

Trümper J, Ross D, Jahr H, Brendel MD, Göke R et Horsch D (2005) *The Rap / B-Raf signalling pathway is activated by glucose and glucagon-like peptide 1 in human islet cells.* Diabetologia 48 : 1 534 – 1 540.

Tsagarakis S (2001) *Food-dependent androgen and cortisol secretion by a gastric inhibitory polypeptide receptor expressive adrenocortical adenoma leading to hirsutism and subclinical Cushing's syndrome : in vivo and in vitro studies.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 86 : 583 – 589.

Tseng CC, Jarboe LA, Landau SB, Williams EK et Wolfe MM (1993) *Glucose-dependent insulintropic peptide : structure of the precursor and tissue-specific expression in rat.* Proceeding of the National Academy of Sciences 90 : 1 992 – 1 996.

Tseng CC, Jarboe LA et Wolfe MM (1994) *Regulation of glucose-dependent insulintropic peptide gene expression by a glucose meal.* American Journal of Physiology 266 : G887 – G891.

Tseng CC, Boylan MO, Jarboe LA, Williams EK, Sunday ME et Wolfe MM (1995) *Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) gene express in the rat salivary gland.* Molecular and Cellular Endocrinology 115 : 13 – 19.

Tseng CC, Boylan MO, Jarboe LA, Usdin TB et Wolfe MM (1996) *Chronic desensitization of the glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor in diabetic rats.* American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism 270 : E661 - E666.

Tseng CC, Kieffer TJ, Jarboe LA, Usdin TB et Wolfe MM (1996) *Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP).* Journal of Clinical Investigation 98 : 2 440 – 2 445.

Tseng CC et Zhang XY (1998) *The cysteine of the cytoplasmic tail of glucose-dependent insulintropic peptide receptor mediates its chronic desensitization and down-regulation.* Molecular and Cellular Endocrinology 139 : 179 – 186.

Tseng CC et Zhang XY (1998) *Role of regulator of G protein signaling in desensibilization of the glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor.* Endocrinology 139 : 4 470 – 4 475.

Tseng CC et Zhang XY (2000) *Role of G protein-coupled receptor kinases in glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor signaling.* Endocrinology 141 : 947 – 952.

Tsukiyama T et Wu C (1997) *Chromatin remodeling and transcription.* Current Opinion in Genetic and Development 7 : 182 – 191.

Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Oiso Y et Seino Y (2006) *Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion.* Molecular Endocrinology 20 : 1 644 – 1 651.

Turk J, Wolf BA et McDaniel ML (1987) *The role of phospholipids-derived mediators including arachidonic acid, its metabolites, and inositoltriphosphate and of intracellular Ca^{2+} in glucose-induced insulin secretion by pancreatic islet.* Progress in Lipid Research 26 : 125 – 181.

Turk J, Gross RW et Ramanadham S (1993) *Amplification of insulin secretion by lipid messengers.* Diabetes 42 : 367 – 374.

Turner R et Tjian R (1989) *Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos/cJun heterodimers.* Science 243 : 1 689 – 1 694.

Uecker JM et Janzow MT (2005) *A case of Cushing's syndrome secondary to ectopic adrenocorticotrophic hormone producing carcinoid of the duodenum.* The american surgeon 71 : 445 – 446.

Unoki M et Nakamura Y (2003) *Methylation at CpG islands in intron 1 of Egr-2 confers enhancer-like activity.* FEBS Letters 554 : 67 – 72.

Udin, TB, Mezey, E, Button, DC, Brownstein, MJ et Bonner, TI (1993) *Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain.* Endocrinology 133 : 2 861 – 2 870.

Vale W, Rivier C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, Bilezikjian L, Bloom F, Rivier J. (1983) *Chemical and biological characterization of corticotrophin releasing factor.* Recent Progress in Hormone Research 39 : 245 – 270.

Vallar L, Spada A et Giannattasio G (1987) *Altered G_s and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas.* Nature 330 : 566 – 568.

Van Eyll B, Göke B, Wilmen A et Göke R (1996) *Exchange of W39 by A within the N-terminal extracellular domain of the GLP-1 receptor results in a loss of receptor function.* Peptides 17 : 565 – 570.

Van Sande J, Parma , Tonacchera M, Swittens S, Dumont J et Vassart G (1995) *Genetic basis of endocrine disease : somatic and germline mutations of the TSH receptor gene in thyroid diseases.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 80 : 2 577 – 2 585.

Vezzosi D, Cartier D et Regnier C (2007) *Familial adrenocorticotropin (ACTH)-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors.* European Journal of Endocrinology 156 : 21 – 31.

Villardaga JP, De Neef P, Di Paolo E, Bollen A, Waelbroeck M et Robberecht P (1995) *Properties of chimeric secretin and VIP receptor proteins indicate the importance of the N-terminal domain for ligand discrimination.* Biochemical and Biophysical Research Communication 211 : 885 – 891.

VilSBoll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S et Holst JJ (2001) *Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients.* Diabetes 50 : 609 – 613.

VilSBoll T, Krarup T, Madsbad S et Holst JJ (2002) *Defective amplification of the late phase insulin response to glucose by GIP in obese type 2 diabetic patients.* Diabetologia 45 : 1 111 – 1 119.

VilSBoll T, Agarso H, Krarup T et Holst JJ (2003) *Similar elimination rates of glucagons-like peptide 1 in obese type 2 diabetic patients and healthy subject.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 220 – 224.

VilSBoll T, Krarup T, Sonne J, Madsbad S, Volund A, Juul AG, Holst JJ (2003) *Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type I and type II diabetes mellitus.* Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 88 : 2 706 – 2 713.

Vinson GP (2003) *Adrenocortical zonation and ACTH.* Microscopy Research and Technique 61 : 227 – 239.

Volz, A, Goke, R, Lankat-Buttgereit, B, Fehmann, HC, Bode, HP et Goke, B (1995) *Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma*. FEBS letter 373 : 23 – 29.

Von Kölliker RA (1852) *Handbuch der Gewebelehre des Menschen*.

Vossler MR, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW et Stork PJ (1998) *Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor*. Nature 392 : 622 – 626.

Wahl MA, Plehn RJ, Landsbeck EA, Verspohl EJ et Ammon HP (1992) *Are ionic fluxes of pancreatic beta cells a target for gastric inhibitory polypeptide ?* Molecular and Cellular Endocrinology 90 : 117 – 123.

Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latrocino AC, Campos Carneiro P, Ferreira Alves VA, Zerbini MCN, Liberman B, Carlos Gomes G et Kirschner MA (2000) *Adrenocortical carcinoma : Clinical and laboratory observations*. Cancer 88 : 711 – 736.

Walter W (1934) *The suprarenal cortical syndrome with presentation of ten cases*. Annal of Surgery 100 : 670 – 688.

Wasada T, McCorkle K, Harris V, Kawai K, Howard B e Unger RH (1981) *Effect of gastric inhibitory polypeptide on plasma levels of chylomycron triglycerides in dogs*. Journal of Clinical Investigation 68 : 1 106 – 1 107.

Waterman MR et Bischof LJ (1996) *Mechanisms of ACTH(cAMP)-dependent transcription of adrenal steroid hydroxylases*. Endocrine Research 22 : 615 – 620.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E et Spiegel AM (1991) *Activating mutations of the stimulatory G-protein in the McCune-Albright syndrome*. New England Journal of Medicine 325 : 1 688 – 1 695.

Weir GC, Mojsov S, Hendrick GK et Habener JF (1989) *Glucagon-like peptide 1 (7-37) actions on endocrine pancreas*. Diabetes 38 : 338 – 342.

Weis L et Reinberg D (1992) *Transcription by RNA polymerase II : initiator-directed formation of transcription-competent complexes*. Federation of American societies for experimental biology. Journal 6 : 3 300 – 3309.

Wheeler MB, Gelling RW, McIntosh CHS, Georgiou J, Brown JC et Pederson RA (1995) *Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor : ligand bnding and intracellular signaling properties*. Endocrinology 136 : 4 629 – 4 639.

Wheeler MB, Gelling RW, Hinke SA, Tu B, Pederson RA, Lynn F, Ehses J et McIntosh CHS (1999) *Characterization of the carboxyl-terminal domain of the rat glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor*. The Journal of Biological Chemistry 274 : 24 593 – 24 601.

White NR, Mulligan P, King PJ et Sanderson IR (2006) *Sodium butyrate-mediated Sp3 acetylation represses human insuline-like growth factor binding protein 3 expression in intestinal epithelial cells*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 42 ; 134 – 141.

Wildhage I, Trusheim H, Göke B et Lankat-Buttgereit B (1999) *Gene expression of the human glucagons-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3.* Endocrinology 140 : 624 – 631.

Willemborg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP et Bornstein SR (1998) *Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome.* New England Journal of Medicine 339 : 27 – 31.

Williams LT, Gore TB et Lefkowitz RJ (1977) *Ectopic β -adrenergic receptor binding sites : possible molecular basis of aberrant catecholamine responsiveness of adrenocortical tumor adenylate cyclase.* Journal of Clinical Investigation 59 : 319 – 324.

Williams LJS et Abou-Samra AB (2000) *The transcription factors Sp1 and MAZ regulate expression of the parathyroid hormone / parathyroid hormone-related peptide receptor gene.* Journal of Molecular Endocrinology 25 : 309 – 319.

Wilmen A, Van Eyll B, Göke B et Göke R (1997) *Five out of six tryptophan residues in the N-terminal extracellular domain of the rat GLP-1 receptor are essential for its ability to bind GLP-1.* Peptides 18 : 301 – 305.

Wolfe AP et Pruss D (1996) *Targeting chromatin disruption : transcription regulators that acetylate histones.* Cell 84 : 817 – 819.

Wolfe MM, Zhao KB, Glazier KD, Jarboe LA et Tseng CC (2000) *Regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide release by protein in the rat.* American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology 279 : G561 – G566.

Xie D, Chen H, Hamrick M, Zhong Q, Ding KH, Correa D, Williams S, Mulloy A, Bollag W, Bollag RJ, Runner RR, McPherson JC, Insogna K et Isaacs CM (2005) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knock-out mice have altered bone turnover.* Bone 37 : 759 – 769.

Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, King GL, Weir GC et Bonner-Weir S (2007) *Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia : possible contribution to impaired incretin effects in diabetes.* Diabetes 56 : 1 551 – 1 558.

Yamada Y, Hayami T, Nakamura K, Kaisaki PJ, Someya Y, Wang CZ, Seiro S et Seiro Y (1995) *Human Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor : Cloning of the Gene (GIPR) and cDNA.* Genomics 29 : 773 – 775.

Yamaguchi T, Pelling JC, Ramaswamy NT, Eppler JW, Wallace DP, Nagao S, Rome LA, Sullivan LP et Grantham JJ (2000) *cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway.* Kidney International 57 : 1 460 – 1 471.

Yamakita N, Murai T, Ito Y, Miura K, Ikeda T, Miyamoto K, Onami S et Yoshida T (1997) *Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia associated with multiple colon adenomas/carcinomas which showed a point mutation in the APC gene.* Internal Medicine 36 : 536 – 542.

Yared Z, Bourdeau I et Lacroix A (2002) *Failure to control Cushing's syndrome with leuprolide acetate in a case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia with partial regulation of cortisol secretion by LH and hCG.* The Endocrine Society 84th Meeting, San-Francisco, CA (P3-673) : 649

Yasuda K, Inagaki N, Yamada Y, Kubota A et Seino S (1994) *Hamster gastric inhibitory polypeptide receptor expressed in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells : its structure and functional properties*. Biochemical and Biophysical Research Communication 205 : 1 556 – 1 562.

Young WF, Carney JA, Musa BU, Wulffraat NM, Lens JW et Drexhage HA (1989) *Familial Cushing's syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease*. New England Journal of Medicine 321 : 1 659 – 1 664.

Yip, RGC, Boylan, MO, Kieffer, TJ et Wolfe MM (1998) *Functional GIP receptors are present on adipocytes*. Endocrinology 139 : 4 004 – 4 007.

Yip RGC et Wolfe MM (2000) *GIP biology and fat metabolism*. Life sciences 66 : 91 – 103.

Zander M, Madshad S, Madsen JL et Holst JJ (2002) *Effect of 6-week course of glucagons-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cells function in type 2 diabetes : a parallel-group study*. Lancet 359 : 824 – 830.

Zawel L et Reinberg D (1992) *Advances in RNA polymerase I transcription*. Current Opinion in Cell Biology 4 : 488 – 495.

Zeiger MA et Norton JA (1993) *Gs alpha : identification of a gene highly expressed by insulinoma and other endocrine tumors*. Surgery 114 : 458 – 463.

Zhang DE, Hoyt PR et Papaconstantinou J (1990) *Localization of DNA protein-binding sites in the proximal and distal promoter regions of the mouse α -fetoprotein gene*. The Journal of Biological Chemistry 265 : 3 382 – 3 391.

Zhang DE, Ge X, Rabek JP, et Papaconstantinou J (1991) *Functional analysis of the trans-acting factor binding sites of the mouse α -fetoprotein proximal promoter by site-directed mutagenesis*. The Journal of Biological Chemistry 266 : 21 179 – 21 185.

Zhong Q, Bollage RJ, Dransfield DT, Gasalla-Herraiz J, Ding KH, Min L et Isales CM (2000) *Glucose-dependent insulinotropic polypeptide signaling pathways in endothelial cells*. Peptides 21 : 1 427 – 1 432.

Zhou Q, Lieberman PM, Boyer TG et Berk AJ (1992) *Holo-TFIID supports transcriptinal stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter*. Gene Development 6 : 1964 – 1974.

Zhu Q et Center MS (1994) *Cloning and sequence analysis of the promoter region of the MRP gene of HL-60 cells isolated for resistance to adriamycin*. Cancer Research 54 : 4 488 – 4 492.

Zhu WG, Srinivasan K, Dai Z, Duan W, Druhan LJ, Ding H, Yee L, Villalona-Calero MA, Plass C et Otterson GA (2003) *Methylation of adjacent cpG sites affects spl/sp3 binding and activity in the p21 (Cipl) promoter*. Molecular and Cellular Biology 23 : 4 056 – 4 065.

ANNEXE I

ARTICLE 1

ANALYSIS OF THE PUTATIVE REGULATORY REGION OF THE GASTRIC INHIBITORY POLYPEPTIDE RECEPTOR GENE IN FOOD- DEPENDENT CUSHING'S SYNDROME

Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J et Lacroix A

The Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 91 : 171 – 177

(2004)

Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome

S.R. Antonini, N. N'Diaye, V. Baldacchino, P. Hamet, J. Tremblay, A. Lacroix*

Laboratories of Endocrine Pathophysiology, Cellular Biology of Hypertension, and Molecular Medicine, Department of Medicine, Hôtel-Dieu du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Canada H2W 1T8

Received 22 September 2003; accepted 1 March 2004

Abstract

Gastric inhibitory polypeptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome (CS) results from the ectopic expression of non-mutated GIP receptor (hGIPR) in the adrenal cortex. We evaluated whether mutations or polymorphisms in the regulatory region of the GIPR gene could lead to this aberrant expression. We studied 9.0 kb upstream and 1.3 kb downstream of the GIPR gene putative promoter (pProm) by sequencing leukocyte DNA from controls and from adrenal tissues of GIP- and non-GIP-dependent CS patients. The putative proximal promoter region (800 bp) and the first exon and intron of the hGIPR gene were sequenced on adrenal DNA from nine GIP-dependent CS, as well as on leukocyte DNA of nine normal controls. Three variations found in this region were found in all patients and controls; at position -4/-5, an insertion of a T was seen in four out of nine patients and in five out of nine controls. Transient transfection studies conducted in rat GC and mouse Y1 cells showed that the TT allele confers loss of 40% in the promoter activity. The analysis of the 8-kb distal pProm region revealed eight distal single nucleotide polymorphisms (SNPs) without probable association with the disease, since frequencies in patients and controls were very similar. In conclusion, mutations or SNPs in the regulatory region of the GIPR gene are unlikely to underlie GIP-dependent CS.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Adrenal Cushing's syndrome; Ectopic receptors; GIP receptor promoter

1. Introduction

Primary adrenal etiologies are responsible for 15–20% of endogenous Cushing's syndrome (CS) in adults and are the most frequent cause in childhood. In most cases, the regulation of cortisol secretion in adrenal CS, where ACTH is suppressed, is poorly understood. No activating mutations in ACTH receptor gene have been identified in adrenal tumors [1,2]. In primary pigmented micronodular adrenal disease (PPNAD), mutations in the gene coding for the regulatory subunit R1A of protein kinase A (PRKARIA), leading to an increased cAMP-stimulated activity, have been described [3–5]. Mutation of the α subunit of the G protein, which constitutively activates steroidogenesis, is present in adrenocortical cells leading to adrenal nodules, and hypercorticism was described in some cases of McCune–Albright's syndrome [6] and in patients with ACTH-independent macron-

odular hyperplasia (AIMAH) with no other features of this syndrome [7].

In some unilateral cortisol-producing adrenal adenomas and most cases of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, steroidogenesis can be regulated via the aberrant expression or function of one or various hormone receptors such as those for gastric inhibitory polypeptide (GIP), β -adrenergic agonists, luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin, vasopressin (V1-AVPR), and serotonin (5-HT₄R) [8–12].

Food-dependent CS was initially reported in 1987 [13], and in vivo and in vitro studies demonstrated the abnormal regulation of cortisol secretion by GIP in this clinical condition [14–16]. GIP-dependent CS was found to result from the ectopic expression of non-mutated GIPR in adrenal tissues [16–21]. So far, at least 24 cases of GIP-dependent CS have been reported, in AIMAH and in unilateral adenomas [12–21]. In GIP-dependent adrenal tissues, cortisol-stimulating effects of GIP are coupled to an increase of cAMP, but not of IP₃ production [20,21]. In normal human adrenals, GIP stimulation does not increase cortisol secretion [14,20,21]; a small amount of GIPR

* Corresponding author. Present address: Hôtel-Dieu du CHUM, 3850 St-Urbain Street, Montréal, Que., Canada H2W 1T7. Tel.: +1 514 890 8000/14932; fax: +1 514 412 7128.

mRNA occasionally found in human adrenals may reflect its expression in endothelial cells [22,23].

The molecular mechanisms underlying the ectopic expression and function of the membrane hormone receptors are still unknown. Mutations in the coding regions of the GIPR gene were not found in GIP-dependent cases [18,21,24]. The pathophysiology of this syndrome addresses the question of tissue-specific gene expression. In AIMAH, the mutational events must have occurred early in the embryogenesis so that all cortical cells would carry the defect, which is polyclonal; in cases of unilateral adenomas, that have a monoclonal origin, the defect could be a somatic mutation [12]. One possible mechanism could be the presence of mutations or polymorphisms in regulatory regions of the GIP receptor gene altering its expression in adrenal glands by creating or abrogating a binding site for an adrenocortical-specific transcription factor/repressor/co-factor complex.

GIP is a 42-amino acid peptide secreted by K cells of the duodenum and small intestine, in response to food absorption [25], and it acts in concert with glucagon-like peptide (GLP)-1 as the major incretins of glucose-induced insulin secretion [26,27]. GIP exerts its effects by binding to its specific GIP receptor (GIPR). GIPR is expressed in a large number of tissues. In addition to its well-known insulinotropic effect, GIP exerts other physiologic [28–31] and pathophysiologic effects [32–34].

The hGIPR gene is located on chromosome 19q13.2–13.3 and encodes a predicted 466-amino acid protein with 79% identity to the rat homologue [22,35]. Several isoforms have been described; however, only the predicted form with 466 amino acids and another one with a 27-amino acid insertion at the carboxy-terminal region are functional [18,36,37]. The regulatory region of the GIPR gene has been characterized in rats; it is a GC-rich region and contains no TATA box or CAAT motif, but has an initiator element located close to the transcription start site. Transcription binding motifs include a cAMP response element, an octamer-binding site and three SP1 sites; moreover, the region 200 bp upstream seems to repress GIPR transcription in cells that normally do not express this gene [38]. The human GIPR promoter is currently being characterized in our laboratory; its structure and functional elements in the putative proximal promoter are very similar to those of the rat GIPR promoter [39]. In this study, we examined if alterations in the regulatory regions of the GIPR gene underlie the adrenal overexpression of the GIPR gene in GIP-dependent CS.

2. Material and methods

2.1. Patients and controls

DNA was obtained from adrenal tissues of nine patients with GIP-dependent CS (seven AIMAH; two unilateral adenomas); these patients were previously described [24,40,41]. Adrenal DNA from one patient with Cushing's disease, one

patient with vasopressin-dependent CS [42], and leukocyte DNA from nine healthy individuals were used as controls. The institutional ethics committee approved the study protocol.

2.2. DNA analysis

2.2.1. *In silico* analysis of putative promoter (pProm)

The characteristics such as nucleotide profile, repeated sequences distribution, and the identification of potential regulatory elements-binding sites were realized using software programs such as BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), the Mac Vector DNA analysis program (version 6.5.1, 1999, Oxford Molecular Group plc), software for research of simple repeated sequences, CpG islands (<http://repeatmasker.genome.washington.edu/> and <http://www.cbi.ac.uk>), and for sites of potential binding of transcription factors, Tess (<http://www.cbil.upenn.edu/tess>), Transfac (<http://transfac-gbf.de>), and TFsearch (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

2.2.2. DNA preparation

At surgery, adrenal tissues were rapidly collected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. DNA was extracted using either the classical method of alkaline shock or Trizol[®] (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, Canada). Leukocyte DNA was extracted with QIAEX kit (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, Canada).

2.2.3. Polymerase chain reaction (PCR)

The 9-kb upstream region and the 1.3-kb downstream region of the GIPR gene (Cosmid R28204c19—GenBank accession number AC006132) were amplified in several fragments of variable size using the primers listed in the Table 1. PCR reactions contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 0.2 mM each of deoxy-NTP, 20 pmol each sense and antisense primers, 100–200 ng DNA, and 2.5 U Taq DNA polymerase. Thermal cycling consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 30–40 cycles of denaturing at 94°C (30 s), annealing at the temperature specific for each pair of primers (15–30 s), and extension at 72°C (60–120 s), with a final 7 min extension at 72°C . PCR fragments were isolated by electrophoresis in 1–2% agarose gel and extracted using the filter paper DAE81, and purified with phenol-chloroform.

2.2.4. DNA sequencing

The PCR products were directly sequenced using ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) on an automated DNA-sequencer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems/Perkin-Elmer). The primers used in sequencing are shown in Table 1. In some fragments, direct sequencing of PCR products was difficult due to the presence of highly repetitive regions (Ala11A–Ala9AS, Ala17S–Ala15AS, Ala25S–25AS); in these cases, PCR products were subcloned using the

Table 1

Oligonucleotides used for PCR amplification and sequencing the putative regulatory region of the hGIPR gene

Oligonucleotide	Sequence (5'–3')	Position
24s	AGCCTTCCCAACAGACAGG	–8654/–8637
28s	GTTGGGCATGGGCATGGTAGGCAC	–8315/–8298
27s	ACCAGGCATCTACCCACCCCTGAC	–7283/–7260
25s	GCTACCGCACCAGGCCTTTCTGG	–6508/–6494
36s	TCTCTCCGGCTCAGTCCCTG	–5893/–5874
37s	GCCACTGTGTCTGGCCTCTCTTCTTG	–5396/–5371
38s	ACTGCCTTCCTCTGTGGAGT	–4161/–4140
17s	GAGGGTGACGGTGTGAG	–3337/–3320
14s	AGGGAAGGAGACAAGGGT	–2002/–1985
11s	CCAGCCTGGGCAACATGGT	–949/–930
10s	GCGAGTAACCACAACTGCATACTGC	–729/–702
9s	GACTGTGCCTTTCATGGC	–335/–317
8s	CTCCCCGCTTCCGTTCCCT	–104/–84
23as	CTGGGCATCAGAGTGAGAC	–7221/–7239
22as	TACTTGGGAGGCAGAGGCAG	–6360/–6379
36as	ATGGTGGTGGTGGCCTGTGG	–5155/–5175
25as	CTCGCTTCCTGGACTTAGGCTGCC	–3958/–3981
26as	AGTCACCACAGAGTCCTCAGTC	–3252/–3274
15as	ATGGCACCCAACGGGATG	–1960/–1977
10as	GCCATTGGAAAGGCACAGTC	–317/–335
9as	TGTCCCCAGTCCTGCTCCTG	+53/+34
12as	CATCAAGAGACAGAGATGA	+201/+183
11as	GCCCAGAGTAAGTGGAACA	+620/+602
2as	CGGCGCGAAGGGTCTGGTTCGTGCA	+1271/+1246

The first nucleotide of the TSS is considered +1.

Gateway® system and sequenced (Invitrogen-Gibco, Burlington, Canada). For the fragment Ala25S–25AS, an internal fragment was obtained using Ala36S–Ala36AS and subsequently subcloned. When subcloning was necessary, five clones were sequenced in each construction in both sense and antisense directions. Sequences containing nucleotide variations were sequenced at least twice.

2.2.5. Transfection study

2.2.5.1. DNA construct. The –103 to +1271 hGIPR promoter/exon/intron region was amplified from DNA of two GIP-dependent CS adrenals, one presenting a single T at –4 and the other presenting a T/TT at the same position. The amplification was obtained using the sense primer, 5'-AAA-AAGCAGGCTCTCCCCGCTTCCGTTCCCT-3' and the antisense primer, 5'-AGAAAGCTGGGTGCGCGGCGAA-GGGTCTGGTTCGTGCA-3'. Cloning in GWpGL3-Basic (luciferase vector) was done with the Gateway™ technology (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions; the presence of T or TT at –4 and orientation was confirmed by dideoxy termination sequencing (Pharmacia).

2.2.5.2. Transient transfection. Mouse adrenal Y1 cells and rat lactosomatotroph GC cells were seeded at 0.8×10^6 cells per plate in 60-mm culture dishes with DMEM 10% FBS, 1× penicillin, and 1× streptomycin. After 24 h, transient transfection was made by the calcium phosphate method, using 5.0 µg of the construction and 2.5 µg of RSV

β-gal. Forty-eight hours post transfection cells were lysed and assayed for luciferase activity in a Dynatech ML 2250 luminometer; results were normalized with β-galactosidase activity and were calculated as fold increase of the control. Each cell line was assayed twice, independently.

3. Results

3.1. Structural analysis of the putative promoter region of the GIPR gene

Although not completely functionally characterized in humans, the pProm region of the GIPR gene was cloned and sequenced by the Human Genome Project. For our study, we considered a region of 9 kb upstream the transcription start site (TSS) of the GIPR gene, the distal 5' region flanking a polyA tail of a yet unidentified gene.

3.1.1. GC content and CpG islands

The GC content of the GIPR pProm greatly varies (20–65%), suggesting that different regions have a higher GC content. In the proximal region of pProm (–1 to –200 bp), there is a GC-rich region that harbors several potential TF-binding sites (see Section 3.1.2). Three other distal regions (–2900/–3200, –3700/–4200, –6040/–6720 bp) are also rich in GC (60–70%). Moreover, four potential CpG islands were revealed by computational analysis, including one in the proximal region of pProm,

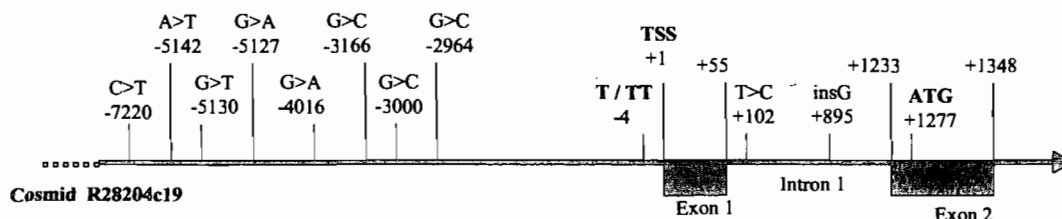


Fig. 1. Position of SNPs found in the putative regulatory region of the GIPR gene in GIP-dependent CS patients and in controls.

but they are short (<200 bp), especially the one near the TSS, which has only 70 bp.

3.1.2. DNA motifs

Analysis of the DNA sequence of the promoter region of GIP-R gene 350 bp upstream to the transcription start site revealed the absence of TATA or CAAT boxes, but the presence of several consensus sites for GC and GT boxes with potential interaction with Sp1 and Sp3 transcription factors. Binding sites for CREB, AP-1, and Oct-1 transcription factors identified in the rat promoter [38] are not observed in the proximal human sequence.

3.2. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the putative promoter region of the GIPR gene

A total of 11 SNPs were identified within the 9-kb upstream region the GIPR gene TSS and the 1.3-kb downstream region in GIP-dependent adrenal tissues and in normal controls (Fig. 1; Table 2).

3.2.1. SNPs in the distal region of pProm

A total of eight polymorphisms were identified within the distal region (−0.8 to −9.0 kb) of the putative promoter region of the GIPR gene in DNA of GIP-dependent adrenal tissues and in genomic DNA from the controls (Table 2). Change 1 was C → T or C → G substitution at nucleotide −7220. Change 2 was A → T substitution at nucleotide −5142. Change 3 was G → T substitution at nucleotide −5130. Changes 4 and 5 were G → A substitution at nucleotides −5127 and −4016, respectively. Changes 6, 7, and 8 were G → C at nucleotides −3166, −3000, and −2964, respectively. Polymorphisms C-7220T/G, G-4016A, G-3166C, G-3000C, and G-2964C seem to occur at high frequency (>50%), both in patients and in controls. Polymorphisms G-5130T and G-5127A seem to be less frequent, both in patients (1/4) and in controls (1/9). Polymorphism A-5142T seems to be less frequent in patients (1/3) than in controls (9/9), but only a small number of patients were studied. Polymorphisms 1, 7, and 8 are located within *Alu* sequences. Polymorphisms 2, 3, and 4 are located within type (A)_{3–16} microsatellite region. Polymorphisms 7 and 8 are located in a possible CpG island, but none of them includes a CpG dinucleotide.

3.2.2. SNPs in the proximal region of pProm

In this report, numbering of the putative GIPR promoter is relative to the first nucleotide of exon 1. The DNA sequencing of the proximal pProm region in the nine GIP-dependent adrenal tissues revealed a SNP at position −4/−5 bp; 5/9 patients presented a single T at this position,

Table 2

Distribution of genotypes and allelic frequency for the putative regulatory region in GIPR gene, in GIP-dependent CS and controls

Polymorphism	Genotypes			Alleles	
−7220	CC	CT	TT	C	T
GIP-AIMAH	33.3	0	66.6	33.3	66.6
Controls	33.3	22.2	44.4	44.4	55.5
−5142	AA	AT	TT	A	T
GIP-AIMAH	66.6	33.3	0	91.6	8.3
Controls	0	77.7	22.2	38.8	61.1
−5130	GG	GT	TT	G	T
GIP-AIMAH	80.0	20.0	0	95.0	5.0
Controls	88.8	11.1	0	94.4	5.5
−5127	GG	GA	AA	G	A
GIP-AIMAH	80.0	20.0	0	95.0	5.0
Controls	88.8	11.1	0	94.4	5.5
−4016	GG	GA	AA	G	A
GIP-AIMAH	0	16.6	83.3	8.3	91.6
Controls	0	44.4	55.5	22.2	77.7
−3166	GG	GC	CC	G	C
GIP-AIMAH	0	100	0	50	50
Controls	33.3	44.4	22.2	55.5	44.4
−3000	GG	GC	CC	G	C
GIP-AIMAH	0	40.0	60.0	20.0	80.0
Controls	0	11.1	88.8	5.5	94.4
−2964	GG	GC	CC	G	C
GIP-AIMAH	0	33.3	66.6	16.6	83.3
Controls	0	44.4	55.5	22.2	77.7
−4	T/T	T/TT	TT/TT	T	TT
GIP-AIMAH	55.5	44.4	0	22.8	77.8
Controls	44.4	55.5	0	27.8	72.2
+102	TT	TC	CC	T	C
GIP-AIMAH	0	0	100	0	100
Controls	0	0	100	0	100
+895	NN	N/insG	InsG/insG	N	InsG
GIP-AIMAH	0	0	100	0	100
Controls	0	0	0	0	100

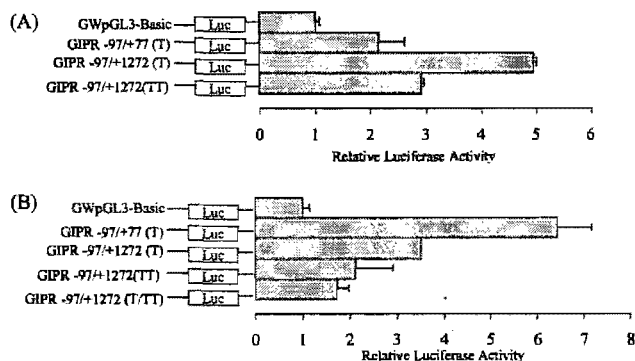


Fig. 2. Transcriptional activity of the GIPR-Luc chimeric genes in mouse Y1 cells and rat GC cells; analysis of two polymorphic variants. Chimeric constructs, containing two polymorphic variations of the human GIPR gene 5'-flanking sequence were co-transfected with pCMV- β -gal in Y1 and GC cells. After incubation for 48 h, luciferase and β -galactosidase activities were measured. The data represent the mean activity \pm S.E. of two different transfections in duplicate; data are normalized to the activity of the promoterless construct, GWpGL3-Basic, after correcting differences in transfection efficiencies by the measurement of β -galactosidase activity. GIPR-Luc chimeras are shown on the left side, adjacent to the relative activity of the chimeric genes on the right side. (A): Y1 cells; (B): GC cells.

while the other four were heterozygotes and presented a T insertion (T/TT). The presence of a homozygous double T, which is the sequence deposited in the GenBank database, was not found in any patient. Sequencing of the genomic DNA of nine controls revealed almost the same genotypic distribution (T/T = 44.5% and T/TT = 55.5%). In human embryonic kidney cells (293HEK) and also in human adrenal H295R cells, the sequencing of this region revealed the presence of only one T.

At nucleotide +102, a homozygous T to C substitution was found in all nine patients as well as in all controls and HEK293 cells; at position +895 a G insertion was also found in all patients and controls.

3.2.3. Functional characterization of -4/-5 bp T/TT alleles

The possible effect of this nucleotide variation on the transcriptional activity of the GIPR gene promoter was assessed by transient transfection assays. Two GIPR-Luc chimeric plasmids were constructed using the promoterless report plasmid GWpGL3-Basic. Each construct (-4 T and -4 TT) contained -103 bp of the proximal pProm region and the first exon and intron (1271 bp) of the GIPR gene placed upstream the firefly luciferase gene. Transcriptional activity was determined by assaying the luciferase activity in transfected GC and Y1 cells. Transfection of both GIPR-Luc constructs resulted in high levels of luciferase activity when compared with pGL3-Basic (Fig. 2). The sequence containing a single T presented a 3.8- and 5.0-fold increase in activity, in mouse GC and rat Y1 cells, respectively. The sequence containing the double TT lead to a weaker increase; 2.8- and 2.9-fold increase, in GC and Y1 cells, respectively. Compar-

ing the effect of these variants, we can see, in both cell lines, that the presence of TT confers 40% less of transcriptional activity when compared with the presence of only one T; co-transfecting T/TT did not prevent the decrease in activity.

4. Discussion

To determine whether genetic alterations in the putative regulatory region of the hGIPR gene could explain the tissue-specific adrenal overexpression of this receptor in GIP-dependent CS, we analyzed an extensive putative regulatory region of the GIPR gene in nine GIP-dependent adrenal tissues as well as in controls. Investigation of this region revealed the presence of 11 nucleotide variations not previously described. We analyzed both a proximal region and also a large distal upstream region, since it has been suggested that *cis*-acting distal regulatory elements may play a role in tissue-specific expression of the GIPR in rats [38]; we also studied the untranslated region downstream the TSS, since regulatory elements may exist in this region. Very close to the TSS, we found a frequent nucleotide variation; at position -4/-5, five patients presented the sequence agtgggGgc, but in four patients there was the presence of a heterozygous variation agtgggGgc/agtgggGgc. The sequence deposited in the GenBank is agtgggGgc, but in human embryonic kidney cells (HEK293) and in human adrenal cancer cell line 295R (H295R) the sequence found was agtgggGgc; in DNA from normal pancreas, the sequence found corresponds to the heterozygous agtgggGgc/agtgggGgc. When we analyzed genomic DNA from controls, the same genotypic distribution was found. The investigation of possible effect of these variants in the transcriptional activity of the GIPR promoter was examined by luciferase activity of the promoter in rat somatomammotrophic GC cells and in mouse adrenal Y1 cells. Interestingly, in both cell lines, the sequence containing TT showed about 40–45% less transcriptional activity when compared to the sequence containing T. When we co-transfected T/TT, to mimic a heterozygous state, the negative effect of double TT persisted. It remains to be studied if this effect persists using a homologous system. The *in vivo* significance of this finding remains to be determined, but as the frequency found in patients was almost the same as in the controls, it unlikely to contribute to the pathogenesis of GIP-dependent CS.

The eight nucleotide variations found in the distal region of pProm of the GIPR gene are likely to be SNPs with no relation with GIP-dependent CS, since none was exclusively found in patients or in controls; all but one (A-5142T) occurred at similar frequencies in the two groups. Three frequent polymorphisms were located within *Alu* sequences, which have usually a high rate of nucleotide variations. It can also be noted that only two polymorphisms were located within possible CpG islands, but none of these belong to a CG dinucleotide, which could theoretically have

some influence on the methylation status of the promoter. Regarding other nucleotide differences found in our series, the homozygous T to C substitution at nucleotide +102 and an insertion of G at +895, both in intron 1, were found in 100% of patients and controls; this could represent a population variation or it may represent simply a mis-annotation in the GenBank.

So far, no mutations or polymorphisms have been described in the region upstream of the TSS and eight polymorphisms were described in the exons/introns of the hGIPR gene (dbSNP/ NCBI-ftp://ftp.ncbi.nih.gov); five of them in coding regions (codons 170, 198, 207, 262, and 354) with four leading to amino acid changes but no association between GIPR polymorphisms and disease has been found [43].

Another possibility, yet to be examined, could be that changes in the methylation status in the promoter of the GIPR gene or in some regulatory gene are involved in its aberrant expression. Methylation of CpG island in the promoter is a powerful means of repressing expression [44,45]. In adrenal tumors, the association between H19 promoter methylation with the expression of IGF-II gene is well known [46]. The analysis of the GIPR gene revealed the presence of some potential, although small, CpG islands, one in the proximal pProm, three in the distal region, and also two localized downstream of the TSS. Future studies will be necessary to investigate if changes in the methylation status in regulatory elements of this gene or in other regulatory genes could be implicated in this condition.

Although larger population genotype studies may be necessary, our study indicates that proximal promoter rearrangements or mutations/SNPs in the regulatory region of the GIPR gene are unlikely to underlie GIP-dependent CS. Further studies will now be necessary to identify the tissue-specific transcription factors involved in the regulation of the hGIP-R gene expression and their potential alterations, which could result in its ectopic adrenal expression in GIP-dependent CS.

Acknowledgements

This work was supported by Grant MT-13189 from the Canadian Institutes of Health Research. SRA was supported by CNPq—Brazil.

References

- [1] A.C. Latronico, M. Reincke, B.B. Mendonca, K. Arai, P. Mora, B. Allolio, B.L. Wajchenberg, G.P. Chrousos, C. Tsigos, No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (1995) 875–877.
- [2] M. Reincke, Mutations in adrenocortical tumors, *Horm. Metab. Res.* 30 (1998) 447–455.
- [3] L.S. Kirschner, J.A. Carney, S.D. Pack, S.E. Taymans, C. Giatzakis, Y.S. Cho, Y.S. Cho-Chung, C.A. Stratakis, Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- α regulatory subunit in patients with the Carney complex, *Nat. Genet.* 26 (2000) 89–92.
- [4] L.S. Kirschner, F. Sandrini, J. Monbo, J.P. Lin, J.A. Carney, C.A. Stratakis, Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKARIA gene in patients with the Carney complex, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 3037–3046.
- [5] L. Groussin, L.S. Kirschner, C. Vincent-Dejean, K. Perlemonne, E. Jullian, B. Delemer, S. Zacharieva, D. Pignatelli, J.A. Carney, J.P. Luton, X. Bertagna, C.A. Stratakis, J. Bertherat, Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKARIA) gene in patients with carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD, *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 1433–1442.
- [6] L.S. Weinstein, A. Shenker, P.V. Gejman, M.J. Merino, E. Friedman, A.M. Spiegel, Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome, *N. Engl. J. Med.* 325 (1991) 1688–1695.
- [7] M.C. Frago, S. Domenice, A.C. Latronico, R.M. Martin, M.A. Pereira, M.C. Zerbin, A.M. Lucon, B.B. Mendonca, Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 2147–2151.
- [8] H.T. Hingshaw, R.L. Ney, Abnormal control in the neoplastic adrenal cortex, in: K.W. McKerns (Ed.), *Hormones and Cancer*, Academic Press, New York, 1974, pp. 309–327.
- [9] A. Lacroix, J. Tremblay, G. Rousseau, M. Bouvier, P. Hamet, Propranolol therapy for ectopic β -adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome, *N. Engl. J. Med.* 337 (1997) 1429–1434.
- [10] A. Lacroix, P. Hamet, J.M. Boutin, Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome, *N. Engl. J. Med.* 341 (1999) 1577–1581.
- [11] H. Mircescu, J. Jilwan, N. N'Diaye, I. Bourdeau, J. Tremblay, P. Hamet, A. Lacroix, Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (2000) 3531–3536.
- [12] A. Lacroix, N. N'Diaye, J. Tremblay, P. Hamet, Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 75–110.
- [13] P. Hamet, P. Larochelle, D.J. Franks, P. Cartier, E. Bolte, Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis, *Clin. Invest. Med.* 10 (1987) 530–533.
- [14] A. Lacroix, E. Bolte, J. Tremblay, J. Dupre, P. Poitras, H. Fournier, J. Garon, D. Garrel, F. Bayard, R. Taillefer, R.J. Flanagan, P. Hamet, Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion—a new cause of Cushing's syndrome, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 974–980.
- [15] Y. Reznik, V. Allali-Zerah, J.A. Chayvialle, R. Leroyer, P. Leymarie, G. Travert, M.C. Lebrethon, I. Budi, A.M. Balliere, J. Mahoudeau, Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 981–986.
- [16] W.W. de Herder, L.J. Hofland, T.B. Usdin, F.H. de Jong, P. Uitterlinden, P. van Koetsveld, E. Mezey, T.I. Bonner, H.J. Bonjer, S.W. Lamberts, Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 3168–3172.
- [17] J.P. Luton, J. Bertherat, J.M. Kuhn, X. Bertagna, Aberrant expression of the GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) receptor in an adrenal cortical adenoma responsible for a case of food-dependent Cushing's syndrome, *Bull. Acad. Natl. Med.* 182 (1998) 1839–1849.
- [18] N. N'Diaye, J. Tremblay, P. Hamet, W.W. de Herder, A. Lacroix, Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 2781–2785.

- [19] C. Noordam, A.R. Hermus, G. Pesman, N. N'Diaye, C.G. Sweep, A. Lacroix, B.J. Otten, An adolescent with food-dependent Cushing's syndrome secondary to ectopic expression of GIP receptor in unilateral adrenal adenoma, *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 15 (2002) 853–860.
- [20] M.C. Lebrethon, O. Avallet, Y. Reznik, F. Archambeaud, J. Combes, T.B. Usdin, G. Narboni, J. Mahoudeau, J.M. Saez, Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 4514–4519.
- [21] O. Chabre, P. Liakos, J. Vivier, P. Chaffanjon, F. Labat-Moleur, M. Martinie, S.P. Bottari, I. Bachelot, E.M. Chambaz, G. Defaye, J.J. Feige, Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83 (1998) 3134–3143.
- [22] T.B. Usdin, E. Mezey, D.C. Button, M.J. Brownstein, T.I. Bonner, Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain, *Endocrinology* 133 (1993) 2861–2870.
- [23] Q. Zhong, R.J. Bollag, D.T. Dransfield, J. Gasalla-Herraz, K.H. Ding, L. Min, C.M. Isles, Glucose-dependent insulinotropic peptide signaling pathways in endothelial cells, *Peptides* 21 (2000) 1427–1432.
- [24] N. N'Diaye, P. Hamet, J. Tremblay, J.M. Boutin, L. Gaboury, A. Lacroix, Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 2616–2622.
- [25] J.C. Brown, R.A. Pederson, Cleavage of a gastric inhibitory polypeptide with cyanogen bromide and the physiological action of the C-terminal fragment, *J. Physiol.* 210 (1970) 52P–53P.
- [26] B. Beck, Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions, *J. Mol. Endocrinol.* 2 (1989) 169–174.
- [27] H.C. Fehmann, R. Gherzi, B. Goke, Regulation of islet hormone gene expression by incretin hormones, *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 103 (Suppl. 2) (1995) 56–65.
- [28] R.G. Yip, M.O. Boylan, T.J. Kieffer, M.M. Wolfe, Functional GIP receptors are present on adipocytes, *Endocrinology* 139 (1998) 4004–4007.
- [29] M. Kogire, K. Inoue, S. Sumi, R. Doi, K. Takaori, M. Yun, N. Fujii, H. Yajima, T. Tobe, Effects of synthetic human gastric inhibitory polypeptide on splanchnic circulation in dogs, *Gastroenterology* 95 (1988) 1636–1640.
- [30] M.A. Nauck, E. Bartels, C. Orskov, R. Ebert, W. Creutzfeldt, Lack of effect of synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide 1 [7–36 amide] infused at near-physiological concentrations on pentagastrin-stimulated gastric acid secretion in normal human subjects, *Digestion* 52 (1992) 214–221.
- [31] R.J. Bollag, Q. Zhong, P. Phillips, L. Min, L. Zhong, R. Cameron, A.L. Mulloy, H. Rasmussen, F. Qin, K.H. Ding, C.M. Isles, Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors, *Endocrinology* 141 (2000) 1228–1235.
- [32] F.C. Lynn, N. Pamir, E.H. Ng, C.H. McIntosh, T.J. Kieffer, R.A. Pederson, Defective glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor expression in diabetic fatty Zucker rats, *Diabetes* 50 (2001) 1004–1011.
- [33] K. Miyawaki, Y. Yamada, H. Yano, H. Niwa, N. Ban, Y. Ihara, A. Kubota, S. Fujimoto, M. Kajikawa, A. Kuroe, K. Tsuda, H. Hashimoto, T. Yamashita, T. Jomori, F. Tashiro, J. Miyazaki, Y. Seino, Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 14843–14847.
- [34] K. Miyawaki, Y. Yamada, N. Ban, Y. Ihara, K. Tsukiyama, H. Zhou, S. Fujimoto, A. Oku, K. Tsuda, S. Toyokuni, H. Hiai, W. Mizunoya, T. Fushiki, J.J. Holst, M. Makino, A. Tashita, Y. Kobara, Y. Tsubamoto, T. Jinnouchi, T. Jomori, Y. Seino, Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity, *Nat. Med.* 8 (2002) 738–742.
- [35] A. Volz, R. Goke, B. Lankat-Buttgereit, H.C. Fehmann, H.P. Bode, B. Goke, Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma, *FEBS Lett.* 373 (1995) 23–29.
- [36] M. Stoffel, A.A. Fernald, M.M. Le Beau, G.I. Bell, Assignment of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene (GIPR) to chromosome bands 19q13.2–q13.3 by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* 28 (1995) 607–609.
- [37] S. Gremlich, A. Porret, E.H. Hani, D. Cherif, N. Vionnet, P. Froguel, B. Thorens, Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor, *Diabetes* 44 (1995) 1202–1208.
- [38] M.O. Boylan, L.I. Jepeal, M.M. Wolfe, Structure of the rat glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene, *Peptides* 20 (1999) 219–228.
- [39] V. Baldacchino, S. Oble, P. Hamet, J. Tremblay, A. Lacroix, Partial characterisation of the 5' flanking region of the human GIP receptor (GIPR) gene, *Endocr. Res.* 28 (2002) 753–754.
- [40] A. Lacroix, N. N'Diaye, W. De Herder, L. Nieman, S. Ezzat, A. Hermus, C. Noordam, H. Gerl, H. Lochs, A. Pico, P. Hamet, J. Tremblay, Adrenal GIP receptor overexpression in food-dependent Cushing's syndrome, in: *Program & Abstracts of the International Congress of Endocrinology*, Abstract P18, Sydney, Australia, 2002, p. 99.
- [41] H. Gerl, W. Rohde, H. Biering, N. Schulz, H. Lochs, Food-dependent Cushing syndrome of long standing with mild clinical features, *Dtsch. Med. Wochenschr.* 125 (2000) 1565–1568.
- [42] A. Lacroix, J. Tremblay, R.M. Touyz, L.Y. Deng, R. Lariviere, J.R. Cusson, E.L. Schiffrin, P. Hamet, Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (1997) 2414–2422.
- [43] A. Kubota, Y. Yamada, T. Hayami, K. Yasuda, Y. Someya, Y. Ihara, S. Kagimoto, R. Watanabe, T. Taminato, K. Tsuda, Y. Seino, Identification of two missense mutations in the GIP receptor gene: a functional study and association analysis with NIDDM: no evidence of association with Japanese NIDDM subjects, *Diabetes* 45 (1996) 1701–1705.
- [44] A.P. Bird, CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature* 321 (1996) 209–213.
- [45] M. Hug, J. Silke, O. Georgiev, S. Rusconi, W. Schaffner, K. Matsuo, Transcriptional repression by methylation: cooperativity between a CpG cluster in the promoter and remote CpG-rich regions, *FEBS Lett.* 379 (1996) 251–254.
- [46] Z.H. Gao, S. Suppola, J. Liu, P. Heikkila, J. Janne, R. Voutilainen, Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (2002) 1170–1176.

ANNEXE II

ARTICLE 2

THE SP TRANSCRIPTION FACTORS ARE INVOLVED IN THE
CELLULAR EXPRESSION OF THE GLUCOSE-DEPENDENT
INSULINOTROPIC POLYPEPTIDE RECEPTOR GENE AND
OVEREXPRESSED IN ADRENAL OF PATIENTS WITH CUSHING'S
SYNDROME

Baldacchino V, Oble S, Décarie PO, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J et
Lacroix A

Journal of Molecular Endocrinology 35 : 61-71 (2005)

The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenals of patients with Cushing's syndrome

Valérie Baldacchino, Sylvie Oble, Patrick-Olivier Décarie, Isabelle Bourdeau, Pavel Hamet¹, Johanne Tremblay¹ and André Lacroix

Laboratory of Endocrine Pathophysiology and ¹Laboratory of Cellular Biology of Hypertension and Molecular Medicine, Department of Medicine, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

(Requests for offprints should be addressed to A Lacroix, Hôtel-Dieu du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, 3850 St Urbain Street, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1T7; [REDACTED])

Abstract

The best characterized effect of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) is its stimulatory effect on insulin secretion by pancreatic β -cells. Recently, it was demonstrated that some cases of primary adrenal Cushing's syndrome were secondary to the ectopic expression of non-mutated GIP receptor (GIP-R) in bilateral adrenal hyperplasias or unilateral adrenal adenomas, resulting in food-dependent steroidogenesis. Using a human multiple-expression tissue array, GIP-R was found to be expressed in a large number of human adult and fetal tissues, but not in the adrenal gland. The analysis of the promoter region of human (h) GIP-R gene revealed six consensus sequences important in regulating the reporter gene activity and capable of binding to Sp1 and Sp3 transcription factors. Data obtained by gene array and semi-quantitative RT-PCR showed an increase in the expression of Sp3 and CRSP9 (co-regulator of Sp1 transcription factor, subunit 9) in the adrenal adenomas or bilateral macronodular hyperplasias of patients with GIP-dependent Cushing's syndrome; they were, however, also increased in some patients with non-GIP-dependent cortisol-secreting adenomas or with ACTH-dependent Cushing's disease. This study represents the first step in our understanding of the mechanisms involved in the regulation of the expression of the hGIP-R gene.

Journal of Molecular Endocrinology (2005) **35**, 61–71

Introduction

Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) regulates the secretion of insulin by pancreatic β -cells (Dupré *et al.* 1973). In rat, GIP receptor (GIP-R) mRNA is expressed not only in pancreatic β -cells, but also in various other tissues, including the gut, heart, pituitary and brain (Usdin *et al.* 1993). GIP-R was also detected in the rat adrenal cortex where it is coupled to corticosterone synthesis (Mazzocchi *et al.* 1999). In human tissues, GIP-R distribution has not been widely studied, but GIP-R mRNA is expressed in the pancreas (Gremlich *et al.* 1995) and brain (Chabre *et al.* 1998). In contrast to rat, GIP-R is not expressed or functionally coupled to steroidogenesis in the human fetal or adult adrenal cortex (Chabre *et al.* 1998, Lebrethon *et al.* 1998, Luton *et al.* 1998, N'Diaye *et al.* 1998, 1999). Several groups have shown that some cortisol- and other steroid-producing unilateral adrenal tumors or bilateral macronodular adrenal hyperplasia may be controlled by the aberrant expression of a diversity of membrane hormone receptors (Lacroix *et al.* 2001, 2004, Bertagna *et al.* 2003).

Hamet *et al.* (1987) were the first to identify food-dependent cortisol production in a patient with unilateral adrenal adenoma and Cushing's syndrome. Further studies demonstrated the involvement of ectopic GIP-R expression in the adrenal tissues of patients with GIP-dependent Cushing's syndrome and bilateral macronodular hyperplasia (Lacroix *et al.* 1992, Reznik *et al.* 1992). GIP-dependent Cushing's syndrome has now been identified in at least 17 patients with adrenocorticotropin (ACTH)-independent macronodular adrenal hyperplasia (Chabre *et al.* 1998, Lebrethon *et al.* 1998, N'Diaye *et al.* 1999, Pralong *et al.* 1999, Croughs *et al.* 2000, Gerl *et al.* 2000, Lacroix *et al.* 2001, Groussin *et al.* 2002, Bertagna *et al.* 2003) and seven with unilateral adenoma (Hamet *et al.* 1987, De Herder *et al.* 1996, Chabre *et al.* 1998, Luton *et al.* 1998, Tsagarakis *et al.* 2001). Sequence analysis of the full-length cDNA of GIP-dependent adrenal tissues revealed no GIP-R mutation in the affected adenomas or macronodular hyperplasia of these patients (N'Diaye *et al.* 1998). Recent analysis also showed that no mutation was present in the promoter region of the human (h) GIP-R gene in the adrenal tissues of patients

with GIP-dependent Cushing's syndrome compared with normal controls (Antonini *et al.* 2004). This suggests that abnormalities in transcription factors or co-factors could be responsible for the ectopic GIP-R expression in these patients.

The recently cloned rat promoter does not have TATA or CAAT boxes but contains potential consensus sequences for Sp1, CREB and Oct-1 transcription factors (Boylan *et al.* 1999). The molecular mechanisms responsible for human GIP-R expression are still unknown. To identify some of the transcription factors involved in the expression of the hGIP-R gene, we partially characterized its proximal promoter region.

Experimental procedures

Human multiple-expression tissue array

A membrane containing mRNA from a large number of adult and fetal tissues was purchased from Clontech (BD Bioscience, Palo Alto, CA, USA). An hGIP-R cDNA probe corresponding to nucleotides 387–1195 and a ubiquitin probe (Clontech) were labeled with [α - 32 P]dCTP, using the Klenow fragment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Hybridization was carried out under conditions described in the protocol from Clontech. Detection was conducted with a PhosphorImager after a 3 day exposure for the GIP-R probe and a 2 h exposure for the ubiquitin probe.

Functional analysis of the hGIP-R gene promoter

Deleted fragments of the hGIP-R gene promoter were amplified by genomic PCR. Mutated fragments were prepared by two rounds of PCR as described by Chen & Przbysla (1994). The fragments were sub-cloned into a pGL-3 Basic vector (Promega Biosciences, San Luis Obispo, CA, USA) and the constructs were verified by sequencing. Human gastric HGT-1 (kindly gifted by Dr C L Laboisse, INSERM, Nantes, France) and mouse adrenocortical Y1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) cell lines were plated in 60 mm dishes in DMEM⁺ (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (BioMedia, Drummondville, QC, Canada) and containing 100 μ g/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). The different promoter reporter gene constructs (2.5 μ g) were transiently co-transfected with an RSV β -gal-containing plasmid (2.5 μ g) by the calcium phosphate precipitation method. The media were changed 24 h after transfections. β -Gal and luciferase activities were measured 48 h after transfection. Luciferase activity was normalized with respect to β -gal activity.

Nuclear extracts and electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Nuclear extracts were prepared according to the method of Andrews & Faller (1991). The probes (see Fig. 3) were labeled with [α - 32 P]dCTP, using the Klenow fragment. Binding reactions were prepared in a final volume of 30 μ l (24 mM Hepes, 3 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 24% glycerol, 3 mM dithiothreitol (DTT), 600 μ g/ μ l BSA, 1 μ g/ μ l poly(dI-dC), 5 μ g nuclear extracts, 150 000 c.p.m. labeled probe) and incubated for 30 min at room temperature. For competition assays, unlabeled specific or non-specific (5' TCTGGAAGGGGATCCGTGTAC ACAGGAAGTGACAATTTTC 3') fragments were added simultaneously with the labeled fragment. When antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was included in the reaction, nuclear extracts and antibody were pre-incubated for 15 min at room temperature before addition of the probe. Complexes were separated on non-denaturing 4% polyacrylamide gel in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer. Detection was undertaken with a PhosphorImager after a 24 h exposure.

Human adrenal tissues studied

Adrenal tissues were collected for this study from patients with Cushing's syndrome associated with either GIP-dependent Cushing's syndrome with confirmed ectopic GIP-R expression (one patient with unilateral adenoma and six patients with bilateral macronodular adrenal hyperplasia), non-GIP-dependent unilateral adrenal adenoma (seven patients), ACTH-dependent Cushing's disease (seven patients) or adrenal carcinoma (two patients), and from three normal adrenal of patients undergoing radical nephrectomy. Commercially available RNA (from a pool of 52 adrenals and from two other normal individuals) was also used as normal control (Clontech and Ambion (Austin, TX, USA) respectively). Informed consent was obtained from each patient and this study was approved by the institutional ethics committee. Tissue specimens obtained at surgery were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen). RNA (3 μ g) was reverse-transcribed using M-MLV RT (Invitrogen) in a final volume of 20 μ l (1 \times first-strand buffer; 10 mM DTT; 0.5 mM dNTPs; 0.01 μ g/ μ l random primers; 1 U/ μ l RNase out; 1 U/ μ l M-MLV RT). PCR was performed using TAQ DNA polymerase (Invitrogen) in a final volume of 50 μ l (1 \times TAQ DNA polymerase buffer; 0.2 μ M specific sense and antisense probes; 0.2 μ M 18S probe (Ambion); 0.2 mM dNTPs; 2 mM MgCl₂; 2 μ l cDNA; 0.05 U/ μ l TAQ DNA polymerase). The linear range for PCR amplification was determined as described in the Quantum RNA 18S internal

standards protocol from Ambion. The number of cycles used for each PCR amplification are indicated in the figure legends. PCR products were separated in a 2% agarose gel and detected using a PhosphorImager. Data are expressed as means \pm S.D. Student's *t*-test was used in the statistical analysis and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

GIP-R expression in human tissues

Distribution of GIP-R mRNA in human tissues was determined by a multiple-expression tissue assay with a blot containing mRNA from 65 adult and seven fetal tissues. In adult tissues (Fig. 1A, lanes A–I), maximal expression was found in the pancreas and trachea. GIP-R was also detected, at a lower level, in the brain, heart, gut, spleen, thymus, blood cells, lung and kidney, whereas it was not seen in the liver, placenta, testis, uterus and adrenal gland. In fetal tissues (Fig. 1A, lane J), the messenger for GIP-R was found in the lung, heart and kidney, but not in the brain, liver, spleen and thymus. Specificity of the probe was confirmed by the absence of signal in the control samples (Fig. 1A, lanes K1–K6). Some of these results were also confirmed by semi-quantitative RT-PCR (Fig. 1B). The expected bands for GIP-R were clearly present in pancreas, brain, trachea, kidney and small intestine, but were only faintly detected in adrenal gland.

Transfection of deleted fragments of the hGIP-R gene promoter

The sequences for the hGIP-R mRNA and promoter are available from GeneBank (NM000164 and AC006132 respectively). The exact localization of the transcription start site is still unknown but we used the 5'-end of the published cDNA sequence as the -1 nucleotide to identify the constructs.

To identify regions of interest, we transfected deleted fragments of the hGIP-R promoter up to 2 kb in HGT-1 and Y1 cells expressing respectively high and low levels of GIP-R mRNA (Fig. 2A). Transfection of HGT-1 cells with deleted fragments from -2068 to -595 bp showed an increase of ~ 5 fold of the control vector in relative luciferase activity whereas, transfection of Y1 cells with these fragments failed to elevate the luciferase activity higher than the control vector. These results suggest that different transcription factors could be able to bind that region of the promoter depending of the cell lines. Deletion of the region between -595 and -473 bp led to a decrease in relative luciferase activity to levels comparable with the control luciferase vector in HGT-1 cells. This observation suggests the presence of a potential response element for an activating factor

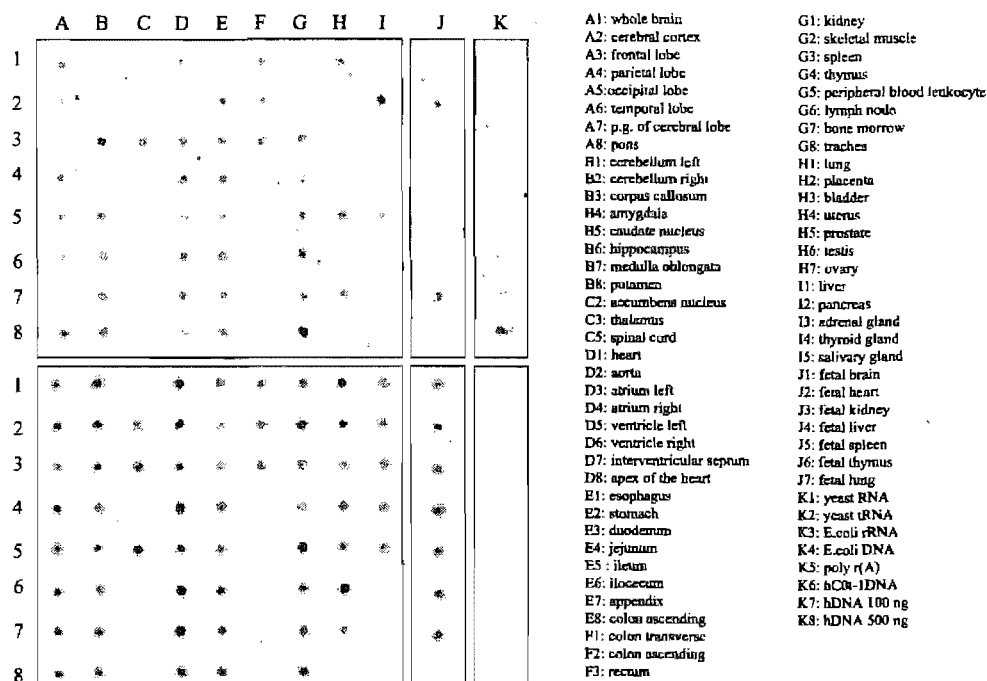
between -595 and -473 bp. In Y1 cells, no modification of the relative luciferase activity was found. Further deletion until -336 bp induced significant elevation of relative luciferase activity in HGT-1 and Y1 cells. The binding of an inhibitor between -473 and -336 bp is probably responsible for that effect. Our hypothesis to explain the effect observed between -336 and -595 bp is that the loss of inhibition with the construct GIPR $-595/+73$ is due to the binding of an activator that interferes with the factors capable of interaction with the inhibitory binding site. Relative luciferase activity was maintained with fragments up to -100 bp, but was not detected with the -49 bp fragment. To ensure that the differences observed in the promoter activity in HGT-1 and Y1 cell lines was not due to the species used, we also transfected some of the constructs in the human HeLa cell line that expresses a low level of GIP-R mRNA. Relative luciferase activity was similar in Y1 and HeLa cell lines.

Characterization of the basal activity of the hGIP-R promoter

The proximal promoter region of the hGIP-R gene revealed a GC-rich region without TATA or CAAT boxes, but contains multiple GC ($-237/-242$, $-77/-82$, $-65/-70$, $-48/-53$) or GT ($-223/-229$, $-150/-156$) boxes (Fig. 3). The sites are potential response elements for transcription factor Sp1.

To better characterize this region of the promoter, we transfected constructs that contained an increasing number of GC/GT boxes in HGT-1 cell lines (Fig. 2B). We also transfected constructs with punctual mutations within the consensus sequences (Fig. 2C). The short 49 bp fragment of the hGIP-R promoter, which does not contain any consensus for transcription factors, did not confer transcriptional activity compared with the control. Minimal basal luciferase activity was observed with the construct GIP-R $-66/+73$ that includes the GC-4 box. We also observed that single mutation of GC-4 led to the abolition of transcriptional activity of the promoter. Taken together, these results suggest that the GC-4 site is essential but not sufficient to confer high luciferase activity. Maximal luciferase activity is detected with the addition of the GC-3 box (construct GIP-R $-75/+73$). Mutation of the GC-3 binding site also led to the abolition of transcriptional activity of the promoter showing that GC-3 is also necessary to confer luciferase activity. The presence of other GC and GT boxes caused only a small change in the promoter activity. Surprisingly, an inactivating mutation of GC-1, GC-2, GT-1 and GT-2 increased the luciferase activity of the promoter. Interactions between protein complexes could be an explanation of these two discordant observations.

(A)



(B)

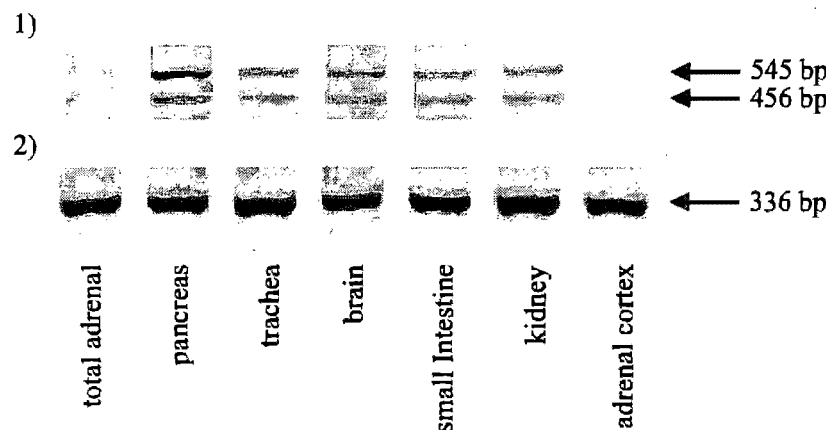


Figure 1 Expression of GIP-R gene in human adult and fetal tissues. (A) Multiple-expression tissue array. Hybridization was carried out under conditions described in the protocol from Clontech with an hGIP-R probe (upper panel) and a ubiquitin probe (lower panel). Detection was performed with the PhosphorImager after 3 days of exposure for the hGIP-R probe and 2 h for the ubiquitin probe. (B) Semi-quantitative RT-PCR. RNA from human adult tissues was reverse-transcribed and then amplified using specific primers for hGIP-R (sense: 5'GGGACAGGCGCTGATCGCCCT3'; antisense: 5'TGTAGCCGCCTGAACAACTC3') (upper panel) and 18S gene (lower panel) for 30 cycles (95 °C/15 s, 55 °C/10 s, 72 °C/1 min). PCR products were run on a 2% agarose gel and detection was performed using a PhosphorImager.

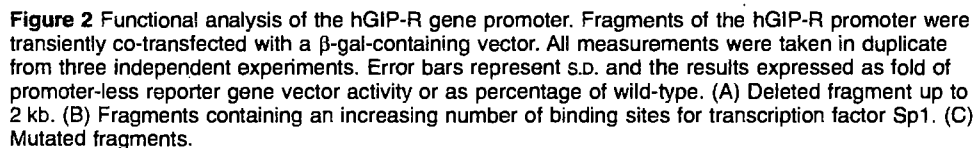


Figure 3 Nucleotide sequence of the hGIP-R gene promoter. The numbers beside the sequence indicate the nucleotide position relative to the 5'-end of the cDNA. Potential transcription factors are in bold. Sequences corresponding to EMSA probes are boxed and mutations introduced in the sequence are described.

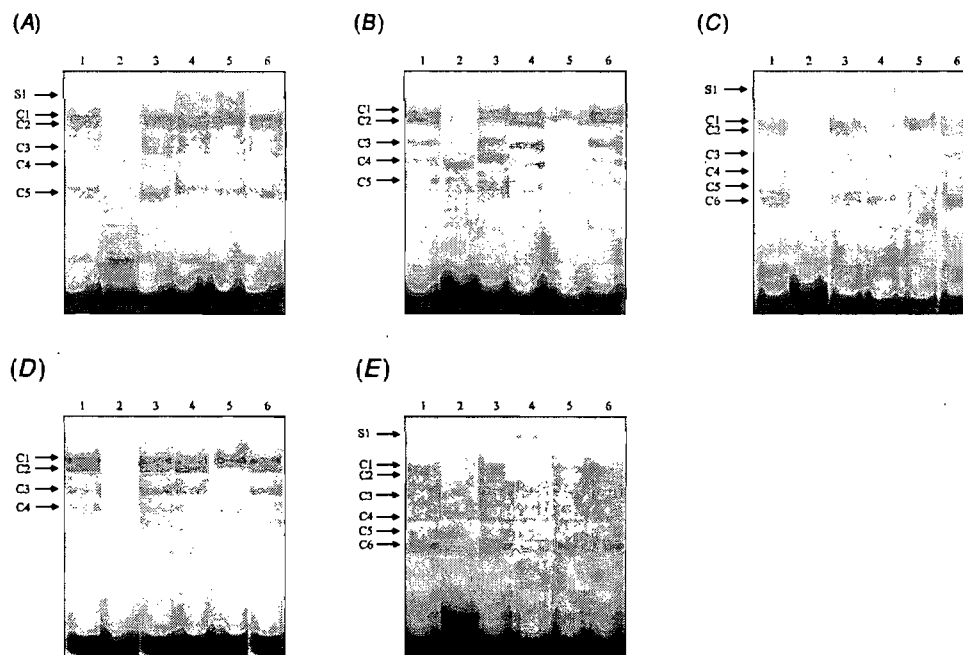


Figure 4 EMSAs. Nuclear extracts from HGT-1 were incubated in the presence of radiolabeled probe each containing one GC or GT boxes. For competition assays, unlabeled fragment was added simultaneously with the labeled fragment, while antibodies were pre-incubated for 15 min at room temperature before addition of the labeled probe. Complexes were separated on non-denaturing 4% polyacrylamide gel. Detection was performed by PhosphorImager after a 24 h exposure. (A) DNA fragment containing GC-1; (B) DNA fragment containing GC-2; (C) DNA fragment containing GC-3; (D) DNA fragment containing GT-1; (E) DNA fragment containing GT-2. Lane 1: incubation with the labeled probe; lanes 2 and 3: competition with 100x excess of unlabeled specific and non-specific probes respectively; lanes 4 and 5: incubation with antibody against Sp1 and Sp3 respectively; lane 6: incubation with pre-immune serum.

EMSA

To identify proteins capable of binding to the GC/GT boxes, we performed EMSAs. Nuclear extracts from HGT-1 cells were incubated with DNA fragments containing one of the GC or GT boxes. The resulting complexes were resolved on non-denaturing polyacrylamide gel (Fig. 4). We observed the formation of four complexes in the presence of the GT-1 probe (Fig. 4D, lane 1) and GC-4 probe (data not shown), five complexes with the GC-2 probe (Fig. 4B, lane 1) and six complexes with the GC-1 (Fig. 4A, lane 1), GC-3 (Fig. 4C, lane 1) and GT-2 probes (Fig. 4E, lane 1). The specificity of binding was demonstrated by competition assay. The complexes were displaced by an increasing amount of unlabeled probe (data not shown). A 100-fold excess of unlabeled specific probe completely abolished the DNA-protein interactions (lane 2). A 100-fold excess of an unlabeled non-specific probe had no effect (lane 3) on the complexes. GC/GT boxes are potential binding sites for the Sp1 transcription factor. To determine if Sp1 was capable of binding to these probes, we incubated nuclear extracts with Sp1 antibody (lane 4). A supershifted band

was produced with a parallel decrease in the abundance of slowly migrating C1 complex using the GC-1, GC-3 and GT-2 probes, whereas the complex C1 disappeared when the Sp1 antibody was pre-incubated with nuclear extracts prior to addition of the GC-2 and GT-1 probes. Transcription factor Sp3 also binds GC/GT-rich element (lane 5). Pre-incubation with Sp3 antibody blocked the formation of the C2 and C3 complexes for the GC-2, GC-3 and GT-1 probes, whereas only the C2 complex was lost in the presence of the GT-2 probe. Pre-incubation of the nuclear extracts with the Sp3 antibody prior to incubation with the GC-1 probe leads to loss of C2 and C4 complexes. Sp1 and Sp3 antibodies were unable to displace the complexes observed in the presence of the GC-4 probe. Pre-incubation of the nuclear extracts with pre-immune serum had no effect on migration of the complexes showing the specificity for the interactions between the antibodies and the shifted complexes (lane 6). Incubating recombinant Sp1 protein in the presence of the wild-type GIP-R promoter probes leads to the formation of only one complex that corresponds to the complex C1 shifted by the Sp1 antibody (data not shown). These data confirm the

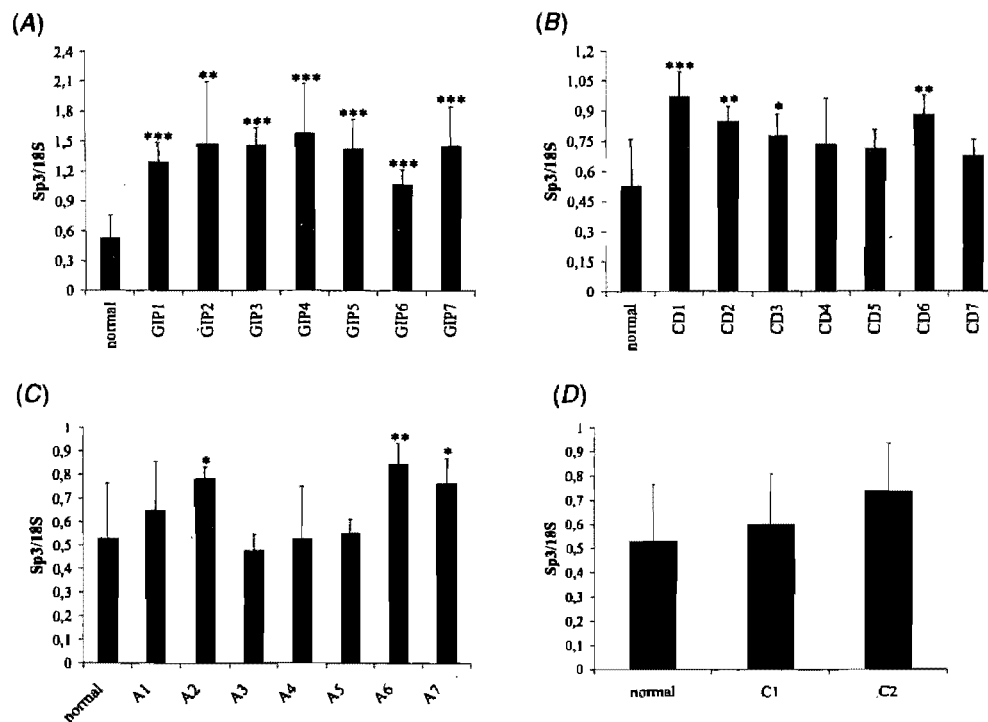


Figure 5 Expression of Sp3. RNA from human adrenal tissues was reverse-transcribed and then amplified using specific primers for Sp3 (sense: 5'AAGTCTATGGGAAGACCTCA3'; antisense: 5'GTACATAGTTAACCTAATTA3') and 18S gene for 30 cycles (95 °C/15 s, 52 °C/20 s, 72 °C/20 s). PCR products were run on a 2% agarose gel and detection was performed using a PhosphorImager. Data result from three independent experiments ($n=3$) performed in duplicate and are expressed as means \pm s.d. Student's *t*-test was used on the statistical analysis and a *P* value less than 0.05 was considered statistically significant. * $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$, *** $P\leq 0.001$. (A) GIP-dependent Cushing's syndrome ('GIP'); (B) Cushing's disease ('CD'); (C) adrenal adenoma ('A'); (D) adrenal carcinoma ('C').

presence of the Sp1 transcription factor in the slowly migrating complex.

Expression of Sp3 and CRSP9 (co-regulator of Sp1 transcription factor, subunit 9) in Cushing's syndrome patients

To identify whether Sp transcription factor family genes are regulated in adrenal tissues of patients with Cushing's syndrome, we performed further analysis by gene array of samples from patients with macronodular adrenal hyperplasia previously described (Bourdeau *et al.* 2004). We found overexpression of the transcription factor Sp3 and the co-factor CRSP9 in adrenal tissues from three patients with GIP-dependent Cushing's syndrome compared with a pool of normal adrenal tissues. These preliminary results were extended by semi-quantitative RT-PCR in a larger number of adrenal tissues from patients with GIP-dependent Cushing's syndrome, non-GIP-dependent adrenal cortisol-secreting tumors, ACTH-dependent Cushing's

disease and controls. We found a 2-fold increase in the expression of Sp3 and CRSP9 in all seven cases of GIP-dependent Cushing's syndrome compared with a normal control (Fig. 5A, Fig. 6A). We also observed a 1.5-fold increase in the expression of Sp3 and CRSP9 in four out of seven cases of Cushing's disease (Fig. 5B, Fig. 6B). In non-GIP-dependent cortisol-secreting adrenal adenoma, Sp3 mRNA was increased 1.3-fold in three out of seven patients (Fig. 5C), while the level of CRSP9 mRNA was not changed (Fig. 6C). No significant difference was observed in two adrenal carcinomas (Fig. 5D, Fig. 6D). GIP-R was not expressed in non-GIP-dependent Cushing's syndrome patients overexpressing CRSP9 and/or Sp3 (Fig. 7).

Discussion

GIP-R is a G protein-coupled receptor widely expressed in rat tissues (Usdin *et al.* 1993). We now demonstrate that GIP-R mRNA is more widely distributed in human

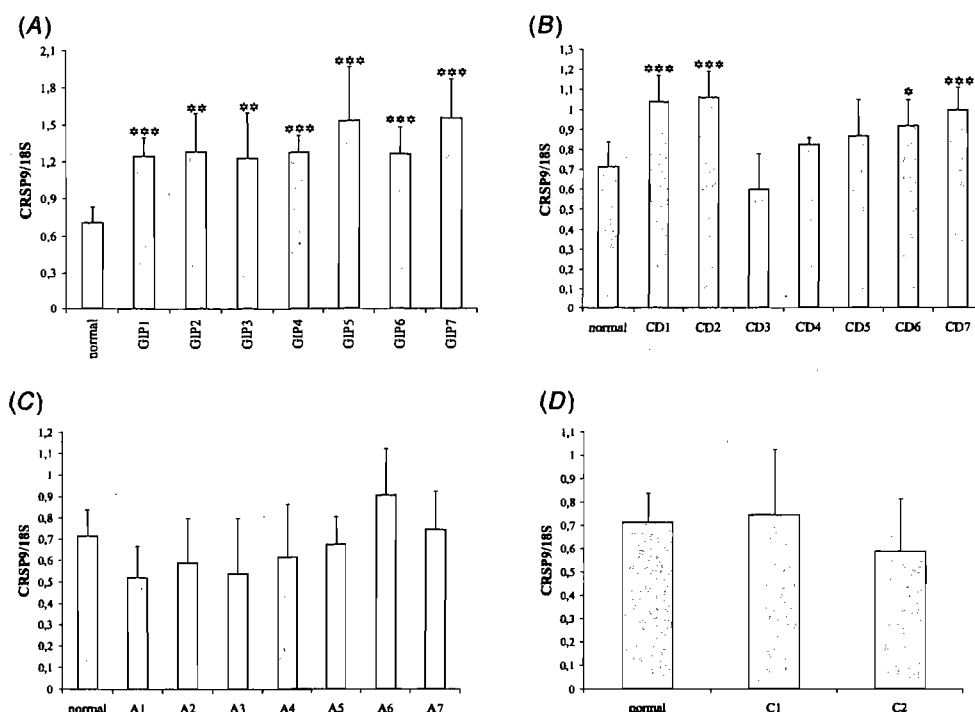


Figure 6 Expression of CRSP9. RNA from human adrenal tissues was reverse-transcribed and then amplified using specific primers for CRSP9 (sense: 5'TACCAGTGTAAAGCCAGA3'; antisense: 5'CATCTCATCAATTAGGACA3') and 18S gene for 30 cycles (95 °C/15 s, 55 °C/20 s, 72 °C/20 s). PCR products were run on a 2% agarose gel and detection was performed using a PhosphorImager. Data result from three independent experiments ($n=3$) performed in duplicate and are expressed as means \pm S.D. Student's t -test was used on the statistical analysis and a P value less than 0.05 was considered statistically significant. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$. (A) GIP-dependent Cushing's syndrome ('GIP'); (B) Cushing's disease ('CD'); (C) adrenal adenoma ('A'); (D) adrenal carcinoma ('C').

tissues than expected from its relatively restricted known biological activities. Identification of GIP-R mRNA in the pancreas is consistent with the role of GIP in the regulation of insulin secretion by the pancreatic β -cells (Dupré *et al.* 1973). As previously described in rat (Usdin *et al.* 1993) and in human (Chabre *et al.* 1998) we also identified GIP-R mRNA in several regions of the brain. GIP-R mRNA was also detected in the trachea, heart, gut, spleen, thymus, blood cells, lung, kidney and thyroid gland. In fetal tissues, GIP-R mRNA was found in lung, heart and kidney. The identification of the messenger for GIP-R in these tissues suggests a number of unknown actions for GIP. However, it remains to be established whether GIP-R mRNA is also translated into functional protein in all these tissues.

GIP-R has been identified and shown to be coupled to steroidogenesis in rat adrenocortical cells (Mazzocchi *et al.* 1999). In this study, we show that GIP-R mRNA is not or very weakly expressed in the normal human adult adrenal gland. The faint band detected after PCR amplification is not efficiently coupled to steroidogenesis (Lacroix *et al.* 1992) and may reflect the presence of GIP-R in endothelial cells rather than in adrenocortical

cells (Zhong *et al.* 2000). This finding is consistent with previous reports demonstrating that GIP-R is expressed in adrenal adenomas or hyperplasias in GIP-dependent Cushing's syndrome, but not in patients with non-GIP-dependent Cushing's syndrome or in adrenal tissues from normal controls (Lacroix *et al.* 1992, Reznik *et al.* 1992, De Herder *et al.* 1996, Chabre *et al.* 1998, Lebrethon *et al.* 1998, Luton *et al.* 1998, N'Diaye *et al.* 1998, 1999).

Sequence analysis of the full-length cDNA or promoter region of the hGIP-R gene revealed no mutation in the affected unilateral adenomas or bilateral macronodular hyperplasias (N'Diaye *et al.* 1998, Antonini *et al.* 2004), suggesting that abnormalities in transcription factors or co-factors could be responsible for the aberrant GIP-R expression in these patients. GIP-R belongs to the family of secretin/glucagon/vasoactive intestinal polypeptide (VIP) receptors, as do receptors for glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and parathyroid hormone (PTH). In recent years, it has been shown that the promoter region of this family of genes is TATA-less and contains a GC-rich region capable of binding to Sp1 transcription factors which are involved in the activation of their transcription (McCuaig *et al.*

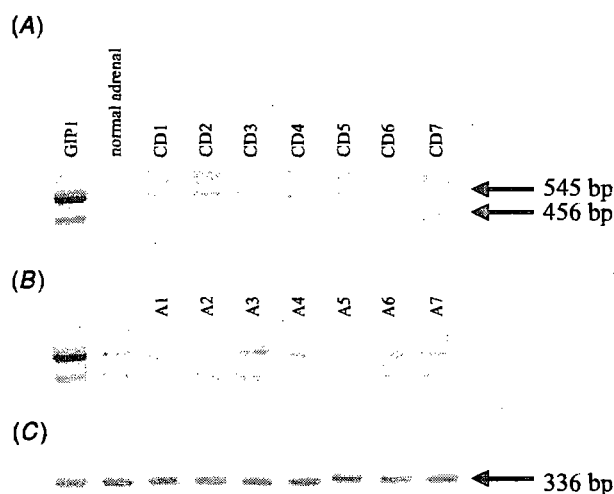


Figure 7 Expression of GIP-R gene in Cushing's syndrome patients. RNA was reverse-transcribed and then amplified using specific primers for hGIP-R (sense: 5'GGGACAGGCCTGATCGCCCT3'; antisense: 5'TGTAGCCGCTGAACAACTC3') and 18S gene for 30 cycles (95 °C/15 s, 55 °C/10 s, 72 °C/1 min). PCR products were run on a 2% agarose gel and detection was performed using a PhosphorImager. (A) Level of hGIP-R mRNA in adrenal tissues from seven patients with Cushing's disease ('CD') as compared with one patient with GIP-dependent macronodular adrenal hyperplasia ('GIP1') and a normal adrenal gland. (B) Level of GIP-R mRNA in seven patients with cortisol-secreting adrenal adenoma ('A') compared with one patient with GIP-dependent macronodular adrenal hyperplasia ('GIP1') and normal adrenal gland. (C) Level of 18S mRNA.

1994, Sreedharan *et al.* 1995, Lankat-Buttgercit & Göke 1997, Buggy *et al.* 1995, Wildhage *et al.* 1999). Cloning of the rat GIP-R gene and its promoter revealed that its promoter was TATA-less and GC-rich, suggesting a mode of regulation similar to that described for other members of the family of secretin/glucagon/VIP receptors (Boylan *et al.* 1999). To better understand the regulation of the expression of hGIP-R gene in normal cells, we first characterized its promoter region. Analysis of the DNA sequence 350 bp upstream to the 5'-end of GIP-R cDNA revealed a GC-rich region containing no TATA or CAAT boxes. We identified six consensus sequences for the Sp1 transcription factors in this region and found them to be functionally important in regulating luciferase reporter gene activity in luciferase assays. Using EMSAs, we confirmed that Sp1 and Sp3 are capable of binding to these sites.

Characterization of the promoter up to 2 kb indicates others regions of potential interest for the regulation of the hGIP-R gene. Deletion of the region between -595 and -473 bp decreased relative luciferase activity to a level similar to the control, suggesting the presence of an activating factor in the region. We also observed that deleted fragments from -2 kb to -473 bp failed to

elevate relative luciferase activity in Y1 cells, while activity was found in HGT-1. The difference between the relative luciferase activity may indicate that different transcription factors could be able to bind that region of the promoter depending of the cell lines. Further studies will be necessary to identify other response elements that could be important for the specific expression of the hGIP-R gene.

We also found that Sp3 and CRSP9, but not Sp1, are overexpressed in the adrenal tissues of all GIP-dependent Cushing's syndrome patients studied as compared with normal adrenal. CRSP9 is an important regulator of Sp1 transcription factor (Ryu *et al.* 1999) and its overexpression could stimulate the promoter of hGIP-R by increasing the activity of Sp1. By contrast, Sp3 is well known to bind DNA with similar specificities and affinities to Sp1. However, while Sp1 acts only as an activator, Sp3 may also exert a repressor activity (Majello *et al.* 1997). As Sp3 and CRSP9 were also overexpressed in the adrenals of some patients with non-GIP-dependent adenomas and with Cushing's disease, who do not express the GIP-R, we conclude that the overexpression of these transcription factors is not sufficient to explain the ectopic expression of GIP-R in food-dependent Cushing's syndrome.

In a recent report, GIP-R was found to be overexpressed in the adrenals of five patients with Cushing's disease and in one with primary pigmented nodular adrenal disease, suggesting that chronic ACTH stimulation or constitutive activation of the ACTH receptor signaling pathway may modulate the expression of GIP-R (Swords *et al.* 2005). Our study does not confirm this hypothesis as we failed to identify significant expression of GIP-R above normal in the adrenals of seven patients with Cushing's disease and in seven patients with unilateral adrenal adenoma. This is consistent with a previous report in one patient with Cushing's disease (N'Diaye *et al.* 1998) and in two patients with ectopic ACTH secretion (Chabre *et al.* 1998).

In conclusion, the hGIP-R gene promoter is TATA-less and contains multiple Sp1/Sp3 binding sites, which appear to be involved in the cellular expression of the receptor. This is similar to previous studies of other members of this family of seven trans-membrane hormone receptors such as VIP, glucagon, PTH and GLP-1 receptors. Further studies will be necessary to identify the tissue-specific transcription factors that are involved in the normal and ectopic expression of hGIP-R resulting in GIP-dependent Cushing's syndrome.

Acknowledgements

The authors acknowledge the editorial assistance of Mr O DaSilva, Editor, Research Support Office, Research Center, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

This work was supported by Grant MT-13189 from the Canadian Institutes of Health Research. P-O D was supported by Fonds de Recherche en Santé du Québec. The authors declared that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- Andrews NC & Faller DV 1991 A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acid Research* **19** 2499.
- Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J & Lacroix A 2004 Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **91** 171–177.
- Bertagna X, Groussin L, Luton JP & Bertherat J 2003 Aberrant receptor-mediated Cushing's syndrome. *Hormone Research* **59** (Suppl 1) 99–103.
- Bourdeau I, Antonini S, Lacroix A, Kirschner LS, Lorang D, Libutti SK & Stratakis CA 2004 Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasias confirms clinical heterogeneity and identifies several genes as molecular mediators. *Oncogene* **23** 1575–1585.
- Boylan MO, Jepeal LI & Wolfe MM 1999 Structure of the rat glucocorticoid-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene. *Peptides* **20** 219–228.
- Buggy J, Hull J & Yoo-Warren H 1995 Isolation and structural analysis of the 5' flanking region of the gene encoding the human glucagon receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **208** 339–344.
- Chabre O, Liakos P, Vivier J, Chaffanjon P, Labat-Moleur F, Martinie M, Bottari SP, Bachelot I, Chambaz EM, Defaye G *et al.* 1998 Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 3134–3143.
- Chen B & Przbysla AE 1994 An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *BioTechniques* **17** 657–659.
- Croughs RJ, Zelissen PM, van Vroonhoven TJ, Hofland LJ, N'Diaye N, Lacroix A & de Herder WW 2000 GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH. *Clinical Endocrinology* **52** 235–240.
- De Herder WW, Hofland LJ, Usdin TB, de Jong FH, Uitterlinden P, Van Koetsveld P, Mezey E, Bonner TI, Bonjer HJ & Lamberts SW 1996 Food-dependent Cushing's syndrome resulting from the abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 3168–3172.
- Dupré J, Watson SA & Brown JC 1973 Stimulation of insulin secretion by GIP in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **37** 826–828.
- Gerl H, Rohde W, Biering H, Schulz N & Lochs H 2000 [Food-dependent Cushing's syndrome of long standing with mild clinical features] *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **125** 1565–1568.
- Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froguel P & Thorens B 1995 Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes* **44** 1202–1208.
- Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Louvel A, Leharp B, Luton JP, Bertagna X & Bertherat J 2002 The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 1980–1985.
- Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P & Bolte E 1987 Cushing's syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clinical and Investigative Medicine* **10** 530–533.
- Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupré J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R *et al.* 1992 Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion – a new cause of Cushing's syndrome. *New England Journal of Medicine* **327** 974–980.
- Lacroix A, N'Diaye N, Tremblay J & Hamet P 2001 Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews* **22** 75–110.
- Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P & Tremblay J 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **15** 375–382.
- Lankat-Buttgereit B & Göke B 1997 Cloning and characterization of the 5' flanking sequence (promoter region) of the human GLP-1 receptor gene. *Peptides* **18** 617–624.
- Lebrethon MC, Avallet O, Archambault F, Combes J, Usdin TB, Narboni G, Mahoudeau J & Saez JM 1998 Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 4514–4519.
- Luton JP, Bertherat J, Kuhn JM & Bertagna X 1998 Aberrant expression of the GIP (gastric inhibitory polypeptide) receptor in an adrenal cortical adenoma responsible for a case of food-dependent Cushing's syndrome. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* **182** 1839–1849.
- Majello B, De Luca P & Lania L 1997 Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *Journal of Biological Chemistry* **272** 4021–4026.
- Mazzocchi G, Rebuffat P, Meneghelli V, Malendowicz LK, Tortorella C, Gottardo G & Nussdorfer GG 1999 Gastric inhibitory polypeptide stimulates glucocorticoid secretion in rats, acting through specific receptors coupled with the adenylate cyclase-dependent signalling pathway. *Peptides* **20** 589–594.
- McCuag KA, Clarke JC & White JH 1994 Molecular cloning, of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. *PNAS* **91** 5051–5055.
- N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, De Herder WW & Lacroix A 1998 Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 2781–2785.
- N'Diaye N, Hamet P, Tremblay J, Boutin JM, Gaboury L & Lacroix A 1999 Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 2616–2622.
- Pralong FP, Gomez F, Guillou L, Mosimann F, Franscella S & Gaillard RC 1999 Food-dependent Cushing's syndrome: possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 3817–3822.
- Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM & Mahoudeau J 1992 Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *New England Journal of Medicine* **327** 981–986.
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG & Tjian R 1999 The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* **397** 446–450.
- Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC & Goetzl EJ 1995 Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene. *PNAS* **92** 2939–2943.

- Swords FM, Alwin S, Perry L, Arola J, Grossman AB, Monson JP & Clark AJL 2005 The aberrant expression of gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic ACTH exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90** 3009–3016.
- Tsagarakis S, Tsigos C, Vassiliou V, Tsiotra P, Pratsinis H, Kletsas D, Trivizas P, Nikou A, Mavromatis T, Sotsiou F *et al.* 2001 Food-dependent androgen and cortisol secretion by a gastric inhibitory polypeptide-receptor expressive adrenocortical adenoma leading to hirsutism and subclinical Cushing's syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 583–589.
- Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ & Bonner TI 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* **133** 2861–2870.
- Wildhage I, Trusheim H, Göke B & Lankat-Buttgereit B 1999 Gene expression of the human glucagon-like peptide-1 receptor is regulated by Sp1 and Sp3. *Endocrinology* **140** 624–631.
- Zhong Q, Bollag RJ, Dransfield DT, Gasalla-Herraiz J, Ding KH, Min L & Isales CM 2000 Glucose-dependent insulinotropic peptide signaling pathways in endothelial cells. *Peptides* **21** 1427–1432.

Received 6 March 2005

Accepted 18 April 2005

ANNEXE III

ARTICLE 3

CUSHING'S SYNDROME VARIANTS SECONDARY TO ABERRANT HORMONE RECEPTORS

Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P et Tremblay J

TRENDS in Endocrinology and Metabolism 15 : 375 - 382 (2004)

Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors

André Lacroix, Valérie Baldacchino, Isabelle Bourdeau, Pavel Hamet and Johanne Tremblay

Laboratories of Endocrine Pathophysiology, Cellular Biology of Hypertension, and Molecular Medicine, Department of Medicine, Hôtel-Dieu du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, H2W 1T8, Canada

The secretion of cortisol and other steroids from adrenal tumors can be regulated by hormones other than corticotropin following the aberrant expression of several G-protein-coupled receptors (GPCRs). To date, ectopic receptors for gastric inhibitory polypeptide, β -adrenergic receptor agonists, vasopressin (V_2 and V_3 receptors), 5-hydroxytryptamine (5-HT₇ receptor) and, probably, angiotensin II (AT₁ receptor) have been identified. Either increased expression or altered activity of eutopic receptors for vasopressin (V_1), luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin, 5-HT (5-HT₄ receptor) and leptin might also be involved. One or more aberrant receptors can be present in unilateral tumors and bilateral macronodular adrenal hyperplasia, at either the early subclinical or overt stages of hormone secretion. The identification of aberrant adrenal GPCRs offers the potential for novel pharmacological therapies that either suppress the endogenous ligands or block the receptor with specific antagonists.

Alteration in the activity of G-protein-coupled receptors (GPCRs) has been identified in several human diseases (Table 1) [1]. Often, gain-of-function disorders are secondary to dominantly transmitted missense mutations that disrupt normal inhibitory mechanisms; the receptor becomes constitutively activated in the absence of its ligand. Other GPCR mutations alter the binding-domain specificity, allowing activation by illicit ligands [2–4]. In Grave's disease, the non-mutant thyrotropin receptor is activated by thyroid-stimulating immunoglobulins. Recent studies of adrenal Cushing's syndrome (CS) have identified a novel gain-of-function mechanism that results from aberrant adrenal expression of several GPCRs that can couple to steroidogenesis [5]. In this review, we focus on studies that examine the diversity, prevalence, potential molecular mechanisms and new pharmacotherapy of aberrant CGRPs in this disease.

Cushing's syndrome

CS results from chronic exposure to excess glucocorticoids and other adrenocortical steroids [6]. Primary adrenal

etiologies account for 15–20% of endogenous CS in adults, and are most commonly secondary to unilateral adenomas and carcinomas. Bilateral adrenal lesions occur in 10–15% of adrenal CS and include corticotropin (ACTH)-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) [6,7]. Excess production of cortisol leads to progressive feedback inhibition of corticotropin-releasing hormone (CRH) and ACTH. Several mechanisms by which cortisol is produced, despite ACTH suppression, have been identified recently. In rare cases of AIMAH, either with or without McCune-Albright syndrome, a somatic *gsp* mutation of $G_{\alpha s}$ induces the constitutive activation of adenylate cyclase leading to formation of adrenocortical nodules and CS [8]. Mutations of the gene that encodes the protein kinase A (PKA) regulatory-subunit type I-A (*PRKARIA*) occur in most patients with Carney complex (CNC), which leads to abnormal PKA signaling in the PPNAD and other affected tissues [7,9].

The prevalence of adrenal lesions found incidentally during abdominal imaging is ~2% in the general population, and they are most often adrenocortical adenomas secondary to adrenocortical adenomas secreting low amounts of cortisol (subclinical CS) [6,10]. Approximately 10–15% of adrenal incidentalomas are bilateral (frequently AIMAH with subclinical CS). Steroidogenesis is relatively inefficient in AIMAH, where the expression of steroidogenic enzymes is relatively decreased and heterogeneous [6,7].

Aberrant expression of GPCRs in CS

Recent work by several groups reveals that some cortisol-producing AIMAH and unilateral adenomas are regulated by the aberrant adrenal expression of either ectopic or overactive eutopic GPCRs [5,11] (Figure 1). In such cases, cortisol secretion becomes driven by a hormone that escapes cortisol-mediated feedback. Studies of the second messengers involved indicate that aberrant GPCRs regulate steroidogenesis by mimicking the cellular events that are triggered normally by the ACTH receptor [5].

Table 1. Human diseases mediated by GPCRs^a

Receptor abnormality	Disease
Loss-of-function	
V ₂ vasopressin receptor	Nephrogenic diabetes insipidus
Corticotropin (MC-2) receptor	Isolated glucocorticoid deficiency
Growth hormone-releasing hormone receptor	Familial growth hormone deficiency
Gonadotropin-releasing hormone receptor	Hypogonadotropic hypogonadism
Thyrotropin receptor	Familial hypothyroidism
Follicle-stimulating hormone receptor	Hypergonadotropic ovarian failure
Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor	Male pseudohermaphroditism
Ca ²⁺ sensing receptor	Familial hypocalciuric hypercalcemia
Melanocortin 4 (MC-4) receptor	Obesity
Parathyroid hormone receptor	Blomstrand chondrodysplasia
Endothelin-B receptor	Hirschsprung's disease
Cone opsins	Color blindness
Rhodopsin receptor	Retinitis pigmentosa
Gain-of-function	
a) Activating mutations	
Thyrotropin receptor (somatic)	Thyroid toxic adenomas
Thyrotropin receptor (germline)	Familial neonatal hyperthyroidism
Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor	Testotoxicosis
Ca ²⁺ sensing receptor	Familial hypoparathyroidism
Parathyroid hormone receptor	Jansen metaphyseal chondrodysplasia
Rhodopsin receptor	Congenital night blindness
b) Mutations that alter the specificity of the binding domain	
Thyrotropin receptor mutation with affinity for human chorionic gonadotropin	Transient hyperthyroidism during pregnancy
Follicle stimulating hormone receptor with affinity for human chorionic gonadotropin	Ovarian hyperstimulation syndrome
c) Illicit activation of a normal GPCR	
Thyrotropin receptor activated by thyroid stimulating immunoglobulins	Grave's disease
Thyrotropin receptor activated by high concentrations of human chorionic gonadotropin	Hyperthyroidism in choriocarcinoma
d) Aberrant GPCRs	
GIP receptor in adrenal adenomas and AIMAH	GIP-dependent CS or hirsutism
Luteinizing hormone receptor in adrenal AIMAH and adenomas	Post-menopausal CS or virilization, transient CS during pregnancy
β -adrenergic receptors in adrenal AIMAH and adenomas	CS
V ₁ , V ₂ and V ₃ vasopressin receptors in adrenal AIMAH and adenomas	CS
5-HT ₄ and 5-HT ₇ receptors in adrenal AIMAH	CS
Angiotensin II (AT-1) receptor in adrenal AIMAH	CS

^aAbbreviations: AIMAH, (ACTH)-independent macronodular adrenal hyperplasia; CS, Cushing's syndrome; GIP, gastric inhibitory polypeptide; GPCRs, G-protein-coupled receptors; 5-HT, 5-hydroxytryptamine.

Gastric inhibitory polypeptide-dependent CS

The adrenal expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor causes 'food-dependent' cortisol production, in which plasma cortisol levels are relatively low during fasting and increase transiently following meals [5,12–14]. GIP-dependent CS has been identified in several countries in at least 17 patients with AIMAH [5,13–20] and in seven patients with unilateral adenoma [5,12,21–24]. The GIP receptor is expressed in GIP-dependent adrenal adenomas and AIMAH, but not in the adrenal cortex of normal adults and fetuses, and in non-GIP-dependent adrenal CS tissues [15,16,22,23,25]. Sequence analysis of the full-length cDNA of GIP-dependent adrenals revealed no mutation in the GIP receptor [22,25]. Furthermore, ectopic expression of the GIP receptor was found in the early stages of adrenal hyperplasia [16] and GIP stimulates cAMP production and DNA synthesis in GIP-dependent cortisol-secreting adenoma cells in primary culture [22]. The latter two findings indicate a role for ectopic GIP receptors in steroid secretion and proliferation of adrenal cells. GIP-dependent androgen secretion and hirsutism was found in an adrenal adenoma, probably

resulting from the GIP-dependent clonal proliferation of a zona reticularis cell (Figure 2) [24].

Vasopressin-responsive CS

Vasopressin-responsive CS has been reported in several patients with either unilateral adenoma or AIMAH who increase their secretion of cortisol with upright posture and other physiological stimuli of endogenous vasopressin [5,26–37]. In most patients, cortisol secretion is regulated by the V₁ vasopressin receptor, which is expressed at either higher or similar levels in the adrenal tissues of vasopressin-responsive CS patients compared to normal individuals [33–37]. No mutations in V₁ receptor cDNA and promoter were found in two patients with AIMAH and CS who had increased responsiveness to vasopressin [34]. In a retrospective study of 26 patients with unilateral cortisol-secreting tumors, plasma cortisol increased after testing with lysine-vasopressin in 27% of cases (five adenomas and two carcinomas) [35]. Because the V₁ receptor is normally present in the adrenal cortex and modulates modest effects on steroidogenesis *in vitro*, the

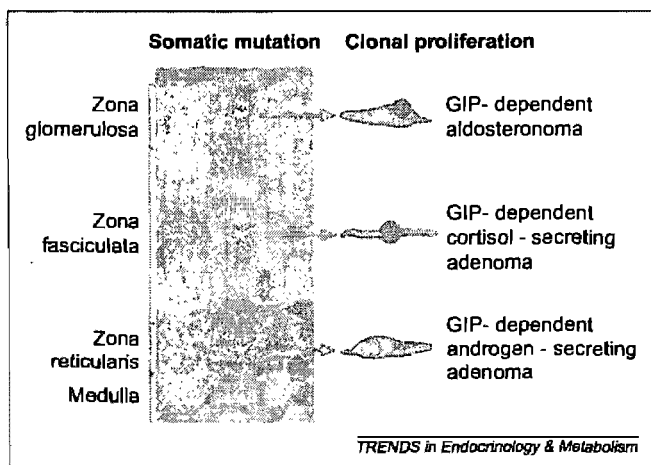


Figure 1. Regulation of steroidogenesis by aberrant hormone receptors in fasciculata cells of adrenal Cushing's syndrome (CS). ACTH (corticotropin) is the physiological modulator of steroidogenesis in the adrenal cortex. Binding to its receptor (ACTHR) activates adenyl cyclase (AC) and leads to cAMP production with cAMP-dependent protein kinase (PKA) activation and phosphorylation of specific transcription factors, which regulate free cholesterol availability and steroidogenic enzymes expression. The ectopic expression of GPCR functionally coupled to steroidogenesis confers inappropriate sensitivity of adrenocortical cells either to GIP (gastric inhibitory polypeptide), to catecholamines (E, NE) or to other hormones (angiotensin-II, glucagon, serotonin 5HT₇, thyrotropin, V₂-vasopressin, etc). These ectopic receptors probably regulate steroidogenesis in adrenal CS by mimicking the cellular events triggered by ACTH receptor activation. In other cases, increased expression or activity of eutopic receptors, such as those for vasopressin (V₁-vasopressin or V₁R), for luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin (LH/hCG), or for serotonin (5-HT₄) induces steroidogenesis through cAMP or other signaling mechanisms. Abbreviations: N, nucleus; M, mitochondria; TF, transcription factor; E, epinephrine; NE, norepinephrine; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol triphosphate; PLC, phospholipase C; CREB, cAMP response element-binding protein; SF-1, steroidogenic factor 1; NGF1-B, orphan nuclear receptor 77; sp-1, specificity protein 1; Pbx-1, human proto-oncogene *pbx-1*. (Modified from Lacroix, A., et al. Aberrant hormone receptors in the pathophysiology of adrenal Cushing's syndrome. In 'Cushing's syndrome', Blevins LS Jr. (Ed), Boston. pp. 229-263, 2002 with permission from Kluwer Academic Publishers).

exaggerated steroidogenic responses to vasopressin is secondary to the increased activity and/or expression of a 'eutopic' receptor-effector system [5,27,33-35]. Recently, ectopic expression of V₂ and V₃ receptors has been reported *in vitro* in some cases of AIMAH, but the effect of dDAVP, a preferential agonist of V₂ receptors, has not been studied *in vivo* [33,36,37].

Catecholamine-dependent CS

The aberrant adrenal expression of β -adrenergic receptors has been identified in four patients with AIMAH and CS who increased their plasma cortisol and aldosterone levels when endogenous catecholamines increased (upright posture, insulin-induced hypoglycemia and exercise) [32,38-40]. Isoproterenol infusion stimulated cortisol and aldosterone secretion in these patients, but not in normal subjects. High-affinity binding sites compatible with either β_1 - or β_2 -adrenergic receptors were coupled efficiently to steroidogenesis in the adrenal tissues of such patients, but not in controls, which indicates the ectopic nature of this receptor [5,38]. The presence of both β -adrenergic receptors and V₁ receptors was identified in the adrenals of two women with AIMAH [32,39]; it was shown that fluctuations in endogenous, physiological levels of vasopressin (water and hypertonic Na⁺ loading) resulted in parallel changes in plasma cortisol levels.

Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin-dependent, serotonin-responsive CS

The luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin (LH/hCG) receptor is expressed normally in the human zona reticularis, and hCG stimulates the secretion of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) from fetal but not adult adrenal cells [41,42]. The aberrant adrenal function of the LH/hCG receptor was first identified in a French-Canadian woman with transient CS during pregnancies; persistent CS and AIMAH developed only after the post-menopausal, long-term increase of LH [43]. Administration of the long-acting gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog leuprolide acetate led to suppression of endogenous LH and normalization of cortisol production. In the same patient, cisapride and metoclopramide, which are agonists at the 5-hydroxytryptamine (5-HT₄) receptor, also stimulated plasma cortisol but the had no effect in several other patients with AIMAH, unilateral adenoma or carcinoma and CS [32,43]. 5-HT₄ agonists are potent stimulators of aldosterone secretion in humans; they weakly increase cortisol secretion by human adrenocortical cells *in vitro*, but do not cause an increase in plasma cortisol levels in normal subjects [44].

Two Dutch women with AIMAH and CS had combined aberrant responses to GnRH, LH, hCG, cisapride and metoclopramide [45]. Although mRNA encoding the LH/hCG receptor was slightly higher in AIMAH than in normal adrenals, the 5-HT₄ receptor was not studied. A woman with CS and aberrant adrenal LH/hCG receptor was also found to have a *gsp* mutation of G α in her unilateral adenoma [46]. In another woman with AIMAH and CS with aberrant responses to GnRH, hCG and LH, suppression of endogenous LH with leuprolide acetate only partially improved hypercortisolism. This indicates the presence of either other, unidentified, aberrant receptors or another mechanism that regulates cortisol secretion [47]; the LH/hCG receptor was expressed in the adrenal but there was no mutation in G α .

The 5-HT₄ receptor was overexpressed in four out of six patients with CS and aberrant responses to either cisapride or metoclopramide; in the two patients with normal levels of 5-HT₄ receptors, there were no differences in either splice variants or in the cDNA sequence of the receptor [48]. An Italian group also found increased adrenal expression of 5-HT₄ receptor transcripts in a patient with AIMAH and cisapride-responsive CS [49]. A female AIMAH patient had predominant hyperaldosteronism and cyclical CS with an aberrant cortisol response to 5-HT₄ agonists [50]. A 59-year-old virilized woman with androgen-secreting AIMAH regulated by hCG expressed the LH/hCGR in one resected adrenal; suppressing endogenous LH with leuprolide acetate normalized androgen secretion from the contralateral adrenal and avoided bilateral adrenalectomy [51]. In these cases, the exaggerated cortisol responses to either LH/hCG or cisapride/metoclopramide appears to be secondary to either the increased expression of LH/hCG and 5-HT₄ receptors in the zona fasciculata or abnormal function of these 'eutopic' receptor-effector systems (Figure 1). More recently, ectopic expression of the 5-HT₇ receptor was identified in patients with 5-HT-responsive AIMAH and CS [36].

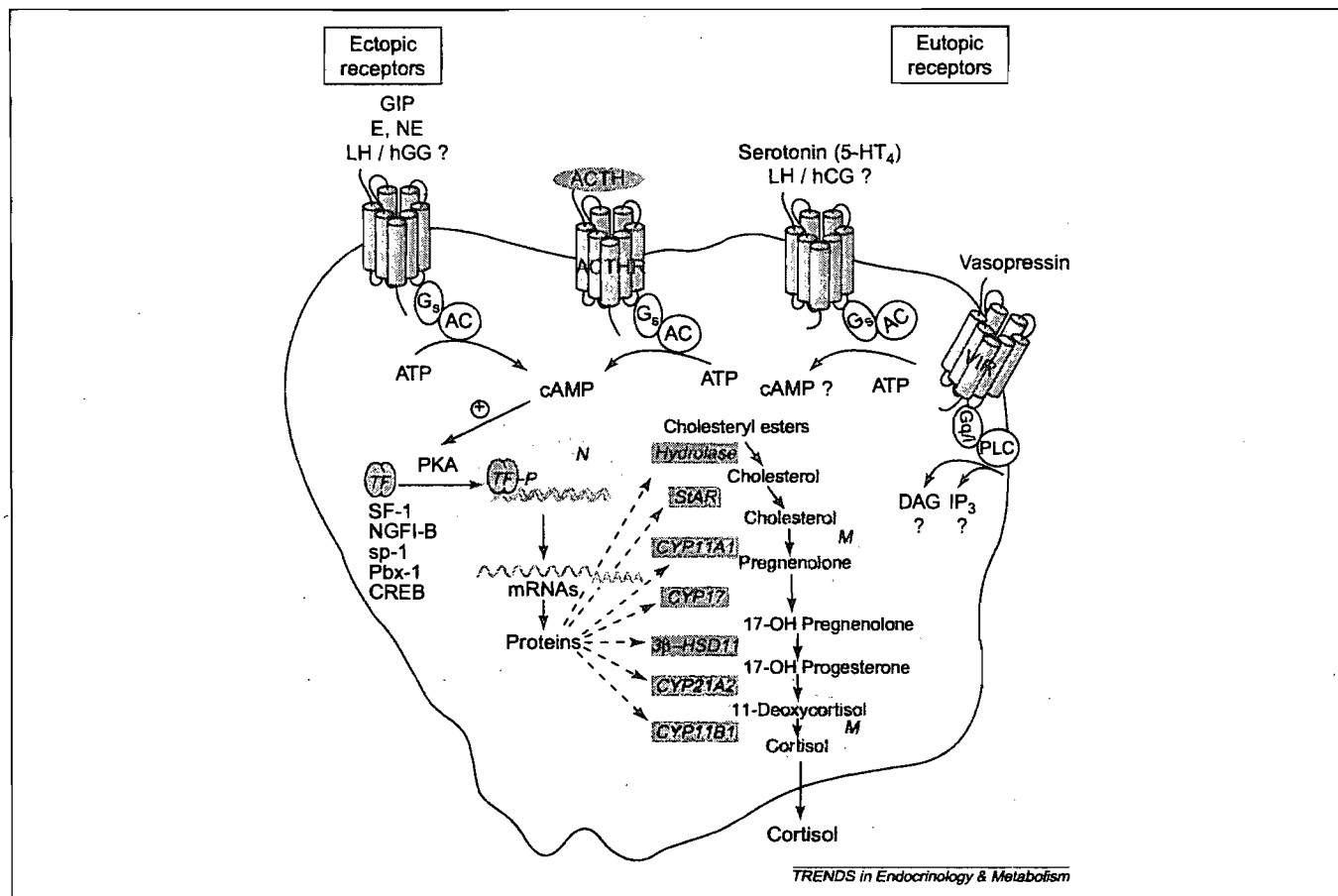


Figure 2. Phenotypic adrenocortical expression of an ectopic GIP receptor. The ectopic expression of the GIP receptor following a somatic mutation in a zona fasciculata cell in the post-natal adrenal cortex will induce its clonal expansion; this will result in GIP-dependent cortisol-secreting adrenal adenoma and food-dependent Cushing's syndrome. When the initial somatic mutation occurs in a cell from the zona reticularis, the phenotype becomes a GIP-dependent adrenal androgen-secreting adenoma. Finally, if the mutation developed in a zona glomerulosa cell, a GIP-dependent aldosteronoma would develop. If the mutation occurred during early embryogenesis in adrenal stem cells or from germline genetic transmission, bilateral macronodular adrenal hyperplasia with variable secretion of cortisol and other adrenal steroids would be present. (Modified from Lacroix, A *et al.* Aberrant hormone receptors in the pathophysiology of adrenal Cushing's syndrome. In 'Cushing's syndrome', Blevins LS Jr. (Ed), Boston. pp. 229–263, 2002 with permission from Kluwer Academic Publishers).

Angiotensin-responsive CS

Vasopressin had no effect on steroidogenesis in a patient with CS, AIMAH and a large increase in plasma aldosterone and cortisol levels during upright posture [52]. Short-term, oral administration of the angiotensin (AT_1) receptor antagonist candesartan completely inhibited the elevation in cortisol and aldosterone. Chronic treatment of the patient with AT_1 receptor antagonists was not attempted and no demonstration *in vitro* of the presence of the AT_1 receptor has been provided. *In vitro* stimulation of cortisol secretion by angiotensin II also occurred in patients with AIMAH and CS who had increases in cortisol levels with upright posture [53].

Systematic screening for the presence of aberrant hormone receptors

Investigation protocols have been developed to systematically evaluate patients with adrenal CS for the presence of aberrant adrenal-hormone receptors [5,32,54–56,58]. The strategy is to modulate the levels of ligands for the potential aberrant receptors using physiological (upright posture and mixed meals) and pharmacological (gonadotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing

hormone, vasopressin, glucagon and metoclopramide) tests, and to examine whether cortisol and other steroids levels are modified. In a systematic clinical screening of 20 consecutive patients with adrenal CS, all six patients with AIMAH had at least one aberrant receptor (two patients with abnormal GIP receptors, one with abnormal LH/hCG and 5-HT₄ receptors, one with an abnormal β -adrenergic receptors, one with an abnormal V₁-vasopressin receptor, and one with abnormal β -adrenergic receptors and V₁ receptors) [32]; only three out of 13 patients with unilateral adenoma had aberrant responses, and responses were normal in the one patient with adrenal carcinoma. The French multicentre group COMEt also studied 11 patients with AIMAH and two with bilateral adenomas [55]. No aberrant responses were found in the latter. However, all 11 AIMAH patients had aberrant cortisol responses to at least one, frequently to several, stimuli (eight to upright posture, two out of four to lysine-vasopressin, four out of ten to combined GnRH/thyrotropin-releasing hormone, six out of ten to either cisapride or metoclopramide, and two to food combined with LH/hCG response). In a French multicentre *in vitro* study, the GIP receptor was detected in one out of 16 unilateral

adenomas, none of 14 carcinomas, and four out of eight AIMAH [20].

The expression of aberrant receptors also occurred in all the four patients with incidentally found AIMAH and subclinical CS: two had combined V_1 receptor, LH/hCG receptor and 5-HT₄ receptor abnormalities; one had combined V_1 receptor and 5-HT₄ receptor abnormalities; and one had an aberrant V_1 receptor [56]. Similarly, a Japanese group found aberrant responses to vasopressin *in vivo* and increased V_1 receptor expression in adrenal tissues of five patients with AIMAH and subclinical CS [57]. In a prospective, multicentre, French study of 21 patients with unilateral adrenal adenoma and either subclinical or mild CS, all had at least one aberrant cortisol response and 86% had subclinical CS and multiple aberrant responses. The most frequent of these were to terlipressin (V_1 receptor, 90%) and cisapride (5-HT₄ receptor, 81%). Interestingly, four out of 21 had a response to exogenous glucagon (first report), four out of 21 to a mixed meal, and three out of eight to infusion of angiotensin II [58].

Based on current studies, we recommend that all patients with AIMAH and clinical CS undergo screening for aberrant receptors because this might change the therapeutic strategy (see later). For patients with unilateral lesions and CS, and for those with subclinical diseases, the screening for aberrant receptors should be conducted in the context of clinical-research projects.

Familial AIMAH

Initially, most cases of AIMAH appeared to be sporadic, but systematic family screening was not performed [7]. There are now six reports of familial cases of AIMAH that indicate autosomal-dominant transmission [37,59–63]. Aberrant V_1 receptors and β -adrenergic receptors were identified in one family [61], β -adrenergic receptors in another [63], and V_1 , V_2 , and V_3 receptors in a third family [37]. Aberrant receptors have not been studied in other families.

Other aberrant hormone receptors

Several studies *in vitro* further support the expression of GPCRs in benign and malignant adrenocortical tumors in humans; these include receptors for thyrotropin, follicle stimulating hormone and interleukin 1, in addition to those confirmed *in vivo* [5,64]. In a woman with GIP-dependent AIMAH, leptin was also found to stimulate cortisol secretion *in vitro* [17]. In a patient with AIMAH and CS without aberrant hormone responses, there was an increase in the adrenal expression of pro-opiomelanocortin/ACTH [65]. In PPNA, either with or without CNC, the paradoxically increased secretion of cortisol following administration of dexamethasone is not associated with aberrant GPCRs, but with overexpression of glucocorticoid receptors in the micronodules [66].

Molecular mechanisms of aberrant hormone receptors

The hormonal regulation of the development and function of the adrenal cortex requires tissue-specific expression of the appropriate hormone receptors. This implies the existence of regulatory mechanisms that involve

cis-acting regulatory elements (promoters) and *trans*-acting factors (transcription factors, co-activators and corepressors) for these receptors. The GIP receptor is the best characterized ectopic receptor in adrenal CS so we first examined whether mutations in its promoter might explain aberrant tissue expression. No mutations and polymorphisms in the regulatory region of the gene that encodes the GIP receptor were identified in GIP-dependent CS [67]. Because several aberrant receptors can be present in the same adrenal, mutations in *trans*-acting factors that are common to these receptors might be more likely. Analysis of the 5' flanking region of the human GIP receptor gene revealed several GC-rich boxes without either TATA or CAAT boxes; members of the Sp family of transcription factors were shown to bind to several of these sites and to regulate the expression of this receptor [68]. Further studies are necessary to identify other tissue-specific transcription factors that are involved in regulating the expression of the gene that encodes the GIP receptor in humans, and mutations that might result in ectopic adrenal expression of GIP receptors in GIP-dependent CS.

Using large-scale, cDNA-microarray analysis, the gene-expression profile of eight AIMAH tissues (including three GIP-dependent) was compared to normal adrenal glands. 82 and 31 genes were found to be upregulated and downregulated, respectively. The former included regulators of transcription, cell cycle and cell adhesion [69]. Sequences that were downregulated include genes that encode enzymes involved in adrenal steroidogenesis. This study has revealed potential new mediators of adrenocortical hyperplasia and/or aberrant expression of hormone receptors that require further investigation.

Another interesting hypothesis emerges from the study of transgenic mice that express a chimeric protein that consists of fragments of the β -subunit of bovine LH and hCG (bLH β -CTP) in their pituitary. These mice develop adrenal CS, polycystic ovaries and ovarian tumors following chronic elevations in serum LH levels [70], which results from ectopic expression of LH/hCG receptors in the adrenal cortex. Because this induction is abolished by gonadectomy, it is proposed that elevated estrogen and prolactin levels are responsible for inducing the illicit adrenal expression of the LH/hCG receptor.

The presence of aberrant receptors in unilateral lesions might arise from a monoclonal somatic mutation. To involve the whole adrenal cortex in patients with AIMAH, the mutation must occur either in the germline or somatically at an early stage of embryogenesis. One can postulate that the primary event is a mutation that results in aberrant adrenal expression of aberrant receptors, leading to increased proliferation and, eventually, increased hormone production. Alternatively, the primary event might be an unknown, proliferative event that leads to cell dedifferentiation and the resultant expression of either one or several genes that encode hormone receptors. Our hypothesis is that the aberrant adrenocortical expression of a receptor is a primary phenomenon that initiates bilateral diffuse hyperplasias and CS. Reversal of the hyperplasia between pregnancies in LH/hCG-dependent CS and the development of long-term hyperplasia following

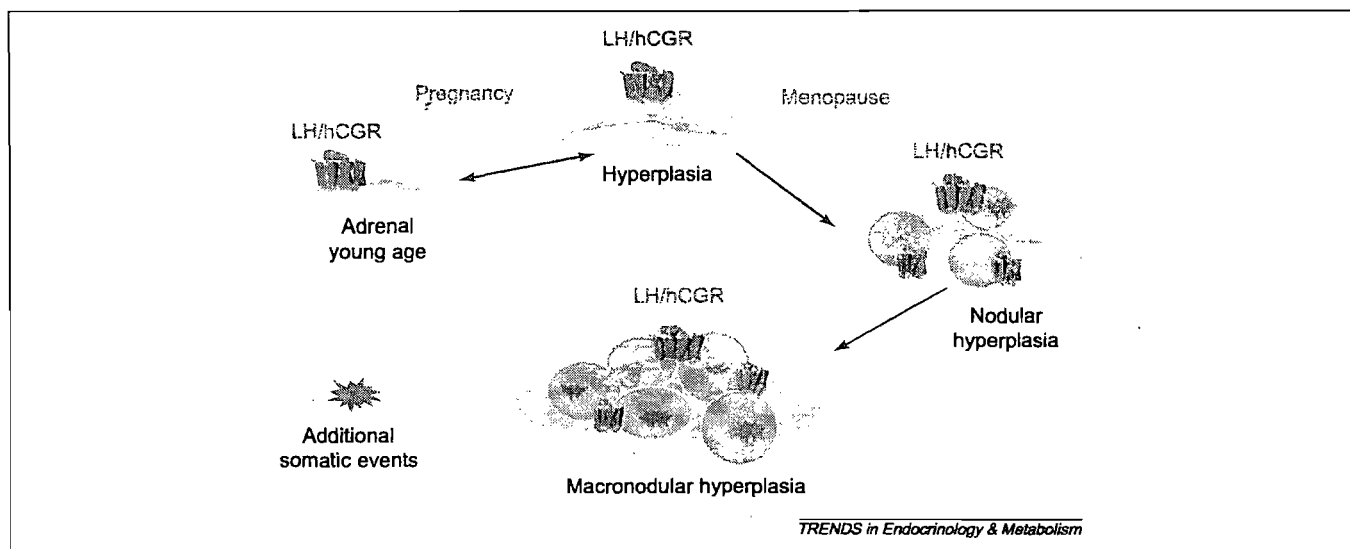


Figure 3. Hypothesis of sequential genetic events leading to AIMAH. The initial event is the aberrant expression of the luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor (LH/hCGR) in the adrenal cortex during early embryonic life. Upon stimulation of this receptor, as during pregnancy (activation by hCG), diffuse adrenal hyperplasia (polyclonal) and transient CS occurs; but this is still reversible when hCG and LH levels are reduced following delivery. After menopause, the constant elevation of LH causes diffuse hyperplasia and CS. Other unidentified (second, third) somatic events occur progressively with time in a small number of cells; the monoclonal proliferation of these cells leads to appearance of several nodules which have maintained the expression of aberrant LH/hCG receptor. The inhibition of LH levels is able to control the excess production of steroids; this might be able to induce regression of adrenal growth at the stage of hyperplasia, but it might become insufficient to cause tumor regression when other oncogenic events have provided additional growth advantage to these cells.

chronic elevation of LH at the menopause supports this hypothesis. In addition to the aberrant receptor, which initiates hyperplasia, other somatic, genetic events occur later, as demonstrated by microarray data [69], which generates diverse, monoclonal nodule formation and the AIMAH phenotype (Figure 3).

An opportunity for new pharmacological therapies

The identification of aberrant adrenal hormone receptors in cortisol-secreting hyperplasias and tumors provides new opportunities for specific pharmacological therapies as alternatives to adrenalectomy. Pharmacological blockade of the postprandial release of GIP with octreotide leads to the clinical and biological improvement of CS. However, this does not persist in the long-term, probably because of the desensitization of somatostatin receptors in GIP-secreting duodenal K cells [5,14,21]. In catecholamine-dependent CS and AIMAH, β -adrenergic receptor antagonists are efficient in the long-term control of hypercortisolism [38,40]. This does not result in hyperplasia regression, but only partial receptor blockade was maintained because more complete blockade caused cortisol deficiency. In LH/hCG-dependent AIMAH and CS, the suppression of endogenous LH levels with long-acting leuprolide acetate controls steroid secretion and avoids bilateral adrenalectomy [43,51]. It is possible that tumor regression might not occur, despite complete blockade of aberrant receptors, because other genetic events that induce proliferative (in addition to the aberrant receptors) might accumulate over time (Figure 3).

Conclusions

In recent years, it has become recognized that evaluation *in vivo* of patients with either ACTH-independent unilateral tumors or AIMAH can identify one or several

aberrant GPCRs that regulate steroid hormone secretion in CS. Further studies are likely to identify more hormone receptor abnormalities and should, eventually, allow the use of pharmacological tools that either inhibit the production of endogenous ligands or specifically antagonize the aberrant receptors. Because the presence of aberrant hormone receptors can be detected at the stage of subclinical steroid hormone production [56–58] and in the context of familial AIMAH screening [37,59–63], it will be interesting to investigate whether the evolution of adrenal tumors and hyperplasias is modified by these new pharmacological approaches. The molecular mechanisms that lead to the aberrant expression of CGRPs and their role in tumor growth remain to be elucidated. Further studies will probably identify more aberrant GPCRs in adrenal tumors, and in other endocrine and non-endocrine tissues.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Sonir Antonini, Nina N'Diaye, Hortensia Mircescu, Jean-Marie Boutin and Sylvie Oble for their contributions to this work. The assistance of Josée Baker in preparing the manuscript and of Bruno St-Pierre for medical illustrations is also appreciated. This work was supported by Grant MT-13189 from the Canadian Institutes of Health Research.

References

- 1 Spiegel, A., Carter Su, C. and Taylor, S. (2003) Mechanism of Action of Hormones that Act at the Cell Surface. In *Williams Textbook of Endocrinology* (Larsen, P.R., Kronenberg, H.M., Melmed, S. and Polonsky, K.S., eds), pp. 45–64, Saunders
- 2 Rodien, P. et al. (1998) Familial gestational hyperthyroidism caused by a mutant thyrotropin receptor hypersensitive to human chorionic gonadotropin. *N. Engl. J. Med.* 339, 1823–1826
- 3 Vasseur, C. et al. (2003) A Chorionic Gonadotropin-Sensitive Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor as a Cause of Familial Gestational Spontaneous Hyperstimulation Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 349, 753–759

- 4 Smits, G. *et al.* (2003) Ovarian Hyperstimulation Syndrome Due to a Mutation in the Follicle-Stimulating Hormone Receptor. *N. Engl. J. Med.* 349, 760–766
- 5 Lacroix, A. *et al.* (2001) Ectopic and Abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome. *Endocr. Rev.* 22, 75–110
- 6 Nieman, L.K. (2001) Cushing's syndrome. In *Endocrinology* (De Groot, L.J. and Jameson, J.L. eds), pp. 1691–1720, W.B. Saunders Company, Philadelphia
- 7 Bourdeau, I. and Stratakis, C.A. (2002) Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 968, 240–255
- 8 Weinstein, L.S. *et al.* (1991) Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N. Engl. J. Med.* 325, 1688–1695
- 9 Kirschner, L.S. *et al.* (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat. Genet.* 26, 89–92
- 10 Reincke, M. (2000) Subclinical Cushing's syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 29, 43–56
- 11 Bertagna, X. (2003) Aberrant receptor-mediated Cushing's syndrome. *Horm. Res.* 59(Suppl 1), 99–103
- 12 Hamet, P. *et al.* (1987) Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin. Invest. Med.* 10, 530–533
- 13 Lacroix, A. *et al.* (1992) Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion—a new cause of Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 327, 974–980
- 14 Reznik, Y. *et al.* (1992) Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N. Engl. J. Med.* 327, 981–986
- 15 Lebrethon, M.C. *et al.* (1998) Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 4514–4519
- 16 N'Diaye, N. *et al.* (1999) Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2616–2622
- 17 Pralong, F.P. *et al.* (1999) Food-dependent Cushing's syndrome: possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3817–3822
- 18 Croughs, R.J. *et al.* (2000) GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 52, 235–240
- 19 Gerl, H. *et al.* (2000) *Dtsch. Med. Wochenschr.* 125, 1565–1568
- 20 Grousas, L. *et al.* (2002) The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1980–1985
- 21 de Herder, W.W. *et al.* (1996) Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 3168–3172
- 22 Chabre, O. *et al.* (1998) Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 3134–3143
- 23 Luton, J.P. *et al.* (1998) *Bull. Acad. Natl. Med.* 182, 1839–1849
- 24 Tsagarakis, S. *et al.* (2001) Food-Dependent Androgen and Cortisol Secretion by a Gastric Inhibitory Polypeptide-Receptor Expressive Adrenocortical Adenoma Leading to Hirsutism and Subclinical Cushing's Syndrome: *in vivo* and *in Vitro* Studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 583–589
- 25 N'Diaye, N. *et al.* (1998) Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2781–2785
- 26 Horiba, N. *et al.* (1995) Lysine vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2336–2341
- 27 Perraudin, V. *et al.* (1995) Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 2661–2667
- 28 Lacroix, A. *et al.* (1997) Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1- vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2414–2422
- 29 Iida, K. *et al.* (1997) Adrenocorticotrophin-independent macronodular adrenal hyperplasia in a patient with lysine vasopressin responsiveness but insensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 47, 739–745
- 30 Yamakita, N. *et al.* (1997) Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia associated with multiple colon adenomas/carcinomas which showed a point mutation in the APC gene. *Intern. Med.* 36, 536–542
- 31 Daidoh, H. *et al.* (1998) *In vivo* and *in vitro* effects of AVP and V1a receptor antagonist on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 49, 403–409
- 32 Mircescu, H. *et al.* (2000) Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 3531–3536
- 33 Mune, T. *et al.* (2002) Ectopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5706–5713
- 34 Campbell, K.K. *et al.* (2004) V1-vasopressin receptor sequence and expression in adrenal Cushing's syndrome with aberrant response to vasopressin. *The Endocrine Society 86th Meeting 2004. Poster P3-416, New Orleans, LO*
- 35 Arnaldi, G. *et al.* (1998) Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2029–2035
- 36 Louiset, E. *et al.* (2004) Pharmacological profile and coupling mechanisms of illegitimate receptors in ACTH-independent macronodular bilateral adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. In: *Program & Abstracts, The Endocrine Society's 86th Meeting*. June 16–19, 2004 Abstract P3-410, p. 564 *New Orleans, LA*
- 37 Lee, S. *et al.* (2004) Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: ectopic expression of vasopressin V1b, V2 receptors in the adrenal gland. In: *Program & Abstracts, The Endocrine Society's 86th Meeting*. June 16–19, 2004 Abstract P3-417, p. 566 *New Orleans, LA*
- 38 Lacroix, A. *et al.* (1997) Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 337, 1429–1434
- 39 Miyamura, N. *et al.* (2003) A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: simultaneous expression of several aberrant hormone receptors in the adrenal gland. *Endocr. J.* 50, 333–340
- 40 Pignatelli, D. *et al.* (2004) Cushing syndrome due to the ectopic expression of adrenergic receptors in the adrenal cortex; a case of ACTH independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH). In: *Program & Abstracts, The Endocrine Society's 86th Meeting*. June 16–19, 2004 Abstract P3-592, p. 611 *New Orleans, LA*
- 41 Pabon, J.E. *et al.* (1996) Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2397–2400
- 42 Seron-Ferre, M. *et al.* (1978) Role of hCG in regulation of the fetal zone of the human fetal adrenal gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46, 834–837
- 43 Lacroix, A. *et al.* (1999) Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 341, 1577–1581
- 44 Lefebvre, H. *et al.* (1998) Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm. Metab. Res.* 30, 398–403
- 45 Feelders, R.A. *et al.* (2003) Luteinizing hormone (LH)-responsive Cushing's syndrome: the demonstration of LH receptor messenger ribonucleic acid in hyperplastic adrenal cells, which respond to chorionic gonadotropin and serotonin agonists *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 230–237
- 46 Bugalho, M.J. *et al.* (2000) Presence of a Gs alpha mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* 14, 50–54
- 47 Yared, Z. Bourdeau I, Lacroix A. (2002) Failure to control Cushing's syndrome with leuprolide acetate in a case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia with partial regulation of cortisol secretion by LH and hCG. *The Endocrine Society 84th Meeting (P3-673):649, San Francisco, CA*

- 48 Cartier, D. *et al.* (2003) Overexpression of serotonin₄ receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 248–254
- 49 Mannelli, M. *et al.* (2003) Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an *in vivo* and *in vitro* study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 4616–4622
- 50 Yared, Z. *et al.* Macronodular adrenal hyperplasia with long-term primary hyperaldosteronism and recent cyclical Cushing's syndrome with aberrant response of cortisol to serotonin 5-HT₄ R agonists. In: Program & Abstracts, *The Endocrine Society's 85th Meeting*. June 18–22, 2003. Abstract P2-568, p. 445, Philadelphia, PA
- 51 Goodarzi, M.O. *et al.* (2003) Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 73–77
- 52 Nakamura, Y. *et al.* (2001) Case of adrenocorticotrophic hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II. *Endocrine* 15, 57–61
- 53 Bertherat, J. *et al.* (2004) Abnormal sensitivity of the adrenocortical tissue to multiple stimuli in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) causing Cushing's syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. In: Program & Abstracts, *The Endocrine Society's 86th Meeting*. June 16–19, 2004 Abstract P3-403, p. 562 New Orleans, LA
- 54 Lacroix, A. *et al.* (1999) Clinical Evaluation of the Presence of Abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome. *Endocrinologist* 9, 9–15
- 55 Bertherat, J., Barrande, G., Lefebvre, H. *et al.* (2003) Illegitimate membrane receptors are frequent and often multiple in bilateral ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *The Endocrine Society 85th Meeting* (P3-410):570, Philadelphia, PA
- 56 Bourdeau, I. *et al.* (2001) Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5534–5540
- 57 Tatsuno, I. *et al.* (2004) Vasopressin responsiveness of subclinical Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60, 192–200
- 58 Reznik, Y., Lefebvre, H., Rohmer, V. *et al.* (2004) Aberrant sensitivity to multiple ligands in unilateral adrenal incidentaloma: a prospective study. *The Endocrine Society 85th Meeting* (P2-575):447, Philadelphia, PA. (*Clinical Endocrinology in press*)
- 59 Findlay, J.C. *et al.* (1993) Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76, 189–191
- 60 Minami, S. *et al.* (1996) ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 44, 483–488
- 61 Miyamura, N. *et al.* (2002) Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland. *Endocrine* 19, 319–326
- 62 Nies, C. *et al.* (2002) Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 110, 277–283
- 63 Imohl, M. *et al.* (2002) *Med. Klin.* 97, 747–753
- 64 Willenberg, H.S. *et al.* (1998) Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 339, 27–31
- 65 Lefebvre, H. *et al.* (2003) Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3035–3042
- 66 Bourdeau, I. *et al.* (2003) Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur *in vitro* and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 3931–3937
- 67 Antonini, S. *et al.* (2004) Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 171–177
- 68 Baldacchino, V. *et al.* Lacroix, A. Characterisation of the proximal 5' flanking region of the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (hGIP-R) gene. In: Program & Abstracts, *The Endocrine Society's 85th Meeting*. June 18–22, 2003 Abstract P2-570, p. 446 Philadelphia, PA
- 69 Bourdeau, I. *et al.* (2004) Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several genes as molecular mediators. *Oncogene* 26, 1575–1585
- 70 Kero, J. *et al.* (2000) Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J. Clin. Invest.* 105, 633–641

AGORA initiative provides free agriculture journals to developing countries

The Health Internetwork Access to Research Initiative (HINARI) of the WHO has launched a new community scheme with the UN Food and Agriculture Organization.

As part of this enterprise, Elsevier has given 185 journals to Access to Global Online Research in Agriculture (AGORA). More than 100 institutions are now registered for the scheme, which aims to provide developing countries with free access to vital research that will ultimately help increase crop yields and encourage agricultural self-sufficiency.

According to the Africa University in Zimbabwe, AGORA has been welcomed by both students and staff. 'It has brought a wealth of information to our fingertips' says Vimbai Hungwe. 'The information made available goes a long way in helping the learning, teaching and research activities within the University. Given the economic hardships we are going through, it couldn't have come at a better time.'

For more information visit:
<http://www.healthinternetwork.net>

ANNEXE IV

ARTICLE 4

EXPRESSION OF ACTH RECEPTOR PATHWAY GENES IN GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC PEPTIDE (GIP)- DEPENDENT CUSHING'S SYNDROME

Antonini SR, Baldacchino V, Tremblay J, Hamet P et Lacroix A

Clinical Endocrinology 64 : 29 - 36 (2006)

ORIGINAL ARTICLE

Expression of ACTH receptor pathway genes in glucose-dependent insulintrophic peptide (GIP)-dependent Cushing's syndrome

Sonir R. Antonini*, Valérie Baldacchino*, Johanne Tremblay†§, Pavel Hamet‡§ and André Lacroix*§

Laboratories of *Endocrine Pathophysiology, †Cellular Biology of Hypertension, and ‡Molecular Medicine, §Division of Endocrinology, Department of Medicine, Research Centre, Hôtel-Dieu du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Québec, Canada

Summary

Objective The molecular mechanisms responsible for glucose-dependent insulintrophic peptide receptor or gastric inhibitory polypeptide receptor (GIPR) ectopic expression and function in GIP-dependent Cushing's syndrome (CS) are still unknown. GIPR presumably acts, like the ACTH receptor (ACTHR), through the Gs protein/cyclic AMP/protein kinase A (PKA) pathway to stimulate steroidogenesis. We studied the expression of several genes involved in this pathway in the adrenal tissues of patients with GIP-dependent CS. **Design and methods** RNA was extracted from adrenal tissues from nine patients with GIP-dependent CS [seven ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH), two adenomas], two control whole adult adrenals, two fasciculata cell-enriched preparations from normal adrenals, seven patients with Cushing's disease (CD) and two normal pancreas. Multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) evaluated the expression of GIPR, ACTHR, SF-1, Nur77, DAX-1, CYP11A, 3 β -HSD, CYP21, CREB and CREM genes.

Results GIPR mRNA was overexpressed in all GIP-dependent cases. In normal adrenals and in the adrenal tissues from patients with CD, minimal amounts of GIPR mRNA were detected. ACTHR mRNA expression was observed in all GIP-dependent adrenal tissues. The expression of steroidogenic enzymes and some specific and ubiquitous transcription factors (TFs) involved in the ACTHR cascade was significantly reduced.

Conclusions Our results indicate that the expression of ACTHR and other genes located downstream in the ACTHR cascade, including steroidogenic enzymes genes and some transcription factors, are relatively suppressed in GIP-dependent CS. Although the expression of aberrant receptors plays an important role in steroidogenesis and initiation of cell proliferation, additional genetic events might occur, altering the activity of the ACTHR pathway.

(Received 5 April 2005; returned for revision 1 May 2005; finally revised 29 June 2005; accepted 16 July 2005)

Introduction

The aberrant regulation of cortisol secretion is frequently found in ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) and in some unilateral adenomas in which a diversity of ectopic or eutopic membrane hormone receptors, such as glucose-dependent insulintrophic peptide or gastric inhibitory polypeptide receptor (GIPR), β -adrenergic-R, LH/hCGR, V₁-vasopressinR and 5-HT₄R, are coupled to steroidogenesis.^{1–4} So far, no mutations have been found in the coding regions or promoters of those receptors and the molecular mechanisms responsible for their aberrant expression and function are still unknown.^{2,5,6}

It has been suggested that most aberrant hormone receptors act, like the ACTH receptor (ACTHR or MC2R), through the Gs protein/adenyl cyclase/cAMP-dependent protein kinase A (Gs/AC/PKA) pathway to stimulate steroidogenesis.² *In vitro* studies have shown the stimulated production of cAMP in adrenal cells from patients with adrenal Cushing's syndrome (CS) to be under the control of several aberrant receptors.^{2,7,8} ACTH was shown to up-regulate its own receptor *in vitro*, probably by regulating one of the cAMP response elements (CREs) in its promoter.^{9–11} However, in ACTH-dependent CS, despite chronically elevated ACTH levels, ACTHR expression is relatively decreased.¹² In CS patients in whom the presence of aberrant adrenal membrane hormone receptors is found, cortisol secretion increases following ACTH administration,^{1,2,8,13} and this response is larger in patients with AIMAH than in those with unilateral adenomas.¹ ACTHR was expressed at a lower level in one GIP-dependent CS adenoma compared to control normal adrenal, while it was almost undetectable in the atrophic adrenal adjacent to the adenoma;⁶ in AIMAH, the ACTHR expression has not yet been studied extensively. Whether GIP or other aberrant ligands can substitute for ACTH in regulating the expression of ACTHR remains to be determined.

Histologically, AIMAH comprises two types of cells, those with clear cytoplasm (lipid-rich) that form cordon nest-like structures,

Correspondence: André Lacroix, Hôtel-Dieu du CHUM, 3850 Saint-Urbain Street, Montréal, Québec, Canada H2W 1T7. Tel.: 514 890 8000/ext. 14932; Fax: 514 412 7128; [REDACTED]

and those with a compact cytoplasm (lipid poor) that form small nest- or island-like structures; both populations are mixed in the diffuse hyperplasia and also form nodules of variable sizes with variable steroidogenic profiles.^{14,15} 3 β -HSD2 was expressed only in large clear cells, whereas CYP17 (P-450C17) was seen predominantly in small compact cells. Immunoreactivities for CYP11A1 (P-450sc), CYP21A2 (P-450c21) and CYP11B1 (P-450C11) were present in both cell types.¹⁵ Few details are known concerning steroidogenesis in AIMAH and in unilateral adenomas under the control of aberrant hormone receptors. It has been postulated that cortisol production is low in individual AIMAH cells and that a significant increase in cell numbers is necessary for overt CS to occur.^{14,16} In this study, we assessed systematically the expression of GIPR, ACTHR, steroidogenic enzymes and some of their regulators in the pathological adrenal tissues of several cases of GIP-dependent CS and compared them with normal adrenals and with adrenal hyperplasia from Cushing's disease (CD).

Subjects and methods

Patients

Adrenal tissues were collected from nine patients with GIP-dependent CS, seven patients with CD and four normal adrenal glands, two from patients undergoing radical nephrectomy and two from organ transplant donors; the last group was used as controls. The characteristics of the GIP-dependent CS patients (seven bilateral AIMAH and two unilateral adenomas) are presented in Table 1. Tissue specimens obtained at surgery were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extraction. This study was approved by the local ethics committee and all patients gave written informed consent.

RNA preparation and multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with an endogenous standard

Total RNA was extracted from the adrenals using Trizol® (Invitrogen). In AIMAH, RNA extracted from nodular hyperplastic tissue

was analysed; in GIP-dependent adenomas, RNA was extracted from adenomatous tissues. First-strand cDNA synthesis was carried out with 2- μ g total RNA and random primers (hexamers) using Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Burlington, Canada) as recommended by the manufacturer. To ensure that the PCR amplification did not result from contaminating genomic DNA, sense and antisense primers were always located in different exons; a control reaction without reverse transcriptase was always performed.

Multiplex RT-PCR using QuantumRNA™ 18S rRNA as an endogenous control¹⁷ was performed according to recommendations by the manufacturer, as follows: the RT-PCR reaction was terminated when all samples were in the linear range of amplification. For each gene, seven RT-PCR reactions with a pool of cDNA from normal adrenals were performed using the specific primers, submitted to PCR, and one tube was removed every four cycles, starting from the twelfth cycle; then, all the PCR products were resolved in ethidium bromide-stained 1.5% agarose gel, detected by Typhoon™ and quantified by ImageQuant™. Cycle number was plotted against the log of the signal and a straight line was obtained for samples in the linear range of amplification; the medium point was chosen. Multiplex PCR using two sets of primers, one to amplify the cDNA of interest and a second to amplify an endogenous control (18S rRNA, QuantumRNA™ 18S Internal Standards, Ambion Inc., Austin, TX, USA), was performed. The product level of the gene of interest was normalized against the product from the control reaction. To obtain a roughly similar amplicon between the two PCR products, the efficiency of rRNA 18S amplification was adjusted choosing the best primers: competitors ratio. Each gene had its expression assessed twice to confirm reproducibility, and the mean value of these two experiments was then used.

The PCR reactions contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM each of deoxy-dNTP, 20 pmol each of sense and antisense primers specific for the gene of interest, 2 μ l of RT-reaction, 2.5 U Taq DNA polymerase and 2 μ l of 18S PCR primer pair. The oligonucleotide primers used to assess the expression of GIPR, ACTHR, CYP11A, 3 β -HSD, CYP21, SF-1, Nur77, DAX-1, CREB and CREM genes are listed in Table 2 and the PCR conditions in Table 3.

Table 1. Summary of the characteristics of the GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome patients*

Patient	Sex	Age (years)	Adrenal lesion	Lowest fasting plasma cortisol (nmol/l)	Cortisol stimulation by meal	Cortisol stimulation by GIP		Reference
						<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	
1	F	33	AIMAH	279	2.4-fold	2.5-fold	ND	N'Diaye <i>et al.</i> ⁵
2	F	43	AIMAH	414	2.4-fold	ND	ND	
3	F	57	AIMAH	275	2.5-fold	2.4-fold	ND	
4	F	40	AIMAH	122	5.6-fold	ND	ND	Gerl <i>et al.</i> ³⁸
5	F	54	AIMAH	198	2.7-fold	ND	ND	
6	M	34	AIMAH	140	5.4-fold	ND	ND	
7	F	60	AIMAH	140	3.6-fold	ND	2.1-fold	Crougns <i>et al.</i> ¹³
8	F	45	Unilateral adenoma	4	4.9-fold	7.8-fold	7.5-fold	De Herder <i>et al.</i> ³⁹
9	F	32	Unilateral adenoma	121	3.1-fold	ND	10-fold	Chabre <i>et al.</i> ⁸

ND, not done.

Table 2. Sequence of oligonucleotides used in RT-PCR

Gene	5' → 3' Oligonucleotide sequence	Strand	Product size (bp)	Reference
hGIPR	GGGACAGGCCTGATCGCCCTT TGTAGCCGCCTGAACAACTC	+ -	456/565	N'Diaye <i>et al.</i> ⁵
hACTHR	ACTGTCCTCGTGTGGTTTTC AGATGAAGACCCCGAGCAG	+ -	565	
hCYP11A	CCTGCAGTGGCACTTGTATG GGTCATCTCTAGCTCAGCGA	+ -	418	Kayes-Wandover & White ⁴⁰
h3β-HSD2	GTGTGCCAGTCTTCATCTAC CAGGGTTAAAGGAAGGCTCC	+ -	524	Kayes-Wandover & White ⁴⁰
hCYP21	TGCCTGCCTATTACAAATGT GGTGAAGCAAAAAACCACG	+ -	369	Kayes-Wandover & White ⁴⁰
hCREB	ATGACCATGGAATCTGGAGC TTAATCTGATTGTGGCAGT	+ -	984	Peri <i>et al.</i> ³⁵
hCREM	GGAAACAGTTGAATCCCAGC AGGCACATCAGAGGACAGTT	+ -	243/390	Peri <i>et al.</i> ³⁵
SF-1	GCATCTTGGGCTGCCTGCAG CCTTGCCGTCTGGACCTGG	+ -	230	Kayes-Wandover & White ⁴⁰
DAX-1	CATGCTGCAGAAGATCCTCA TCCATGCTGACTGTGCCGAT	+ -	431	Kayes-Wandover & White ⁴⁰
hNur77/NGFI-1	TTCAGCACGTTTCATGGACG TAGGCATGGAATAGCTCTCT	+ -	425	

Table 3. PCR cycling conditions for PCR primer pairs

Gene	Denaturing		Annealing		Elongation		Soak		Number of cycles
	Temp. (°C)	Time (s)	Temp. (°C)	Time (s)	Temp. (°C)	Time (s)	Temp. (°C)	Time (s)	
hGIPR	94	30	61	20	72	60	72	420	23
hACTHR	94	30	55	60	72	90	72	120	23
hCYP11A	94	30	58	30	68	60	68	300	23
h3β-HSD2	94	30	61	30	68	60	68	300	23
hCYP21	94	30	58	30	68	60	68	300	25
hCREB	94	30	60	30	68	60	68	300	28
hCREM	94	30	60	30	68	60	68	300	23
SF-1	94	30	60	30	68	60	68	300	23
hNur77/NGFI-B	94	30	58	30	68	60	68	300	23
Dax-1	94	30	62	30	68	60	68	300	28

Statistical analysis

The ratios of mRNA expression for each gene of interest compared to the internal control r18S were calculated as a mean and standard deviation. Comparison between groups was performed using the nonparametric Mann-Whitney test. Pearson's linear correlation test was used to assess correlation between groups. The level of significance was set at $P < 0.05$ in all analyses.

Results

GIPR

Two bands corresponding to the GIPR normal splice variants (545 and 456 bp) were identified. The proportion between these two

GIPR splice variants was the same in GIP-dependent adrenal tissues compared to normal pancreas (0.86 vs. 0.87) (Fig. 1). GIPR mRNA was overexpressed in all GIP-dependent cases ($391 \pm 112\%$) compared to the expression in normal pancreas, arbitrarily considered as 100%. In normal adrenals and in the adrenal tissues of seven patients with CD, only faint bands corresponding to the GIPR could be detected.

ACTHR

The ratio of ACTHR mRNA to r18S internal control was 1.39 ± 0.18 in normal adrenals. ACTHR expression was also present, but reduced, in GIP-dependent tissues (0.76 ± 0.3) and in adrenals from CD patients (0.39 ± 0.25) compared to normal adrenals ($P = 0.004$, $P = 0.006$, respectively) (Fig. 2). There was a significant difference in ACTHR expression between GIP-dependent tissues and adrenal tissues from CD patients

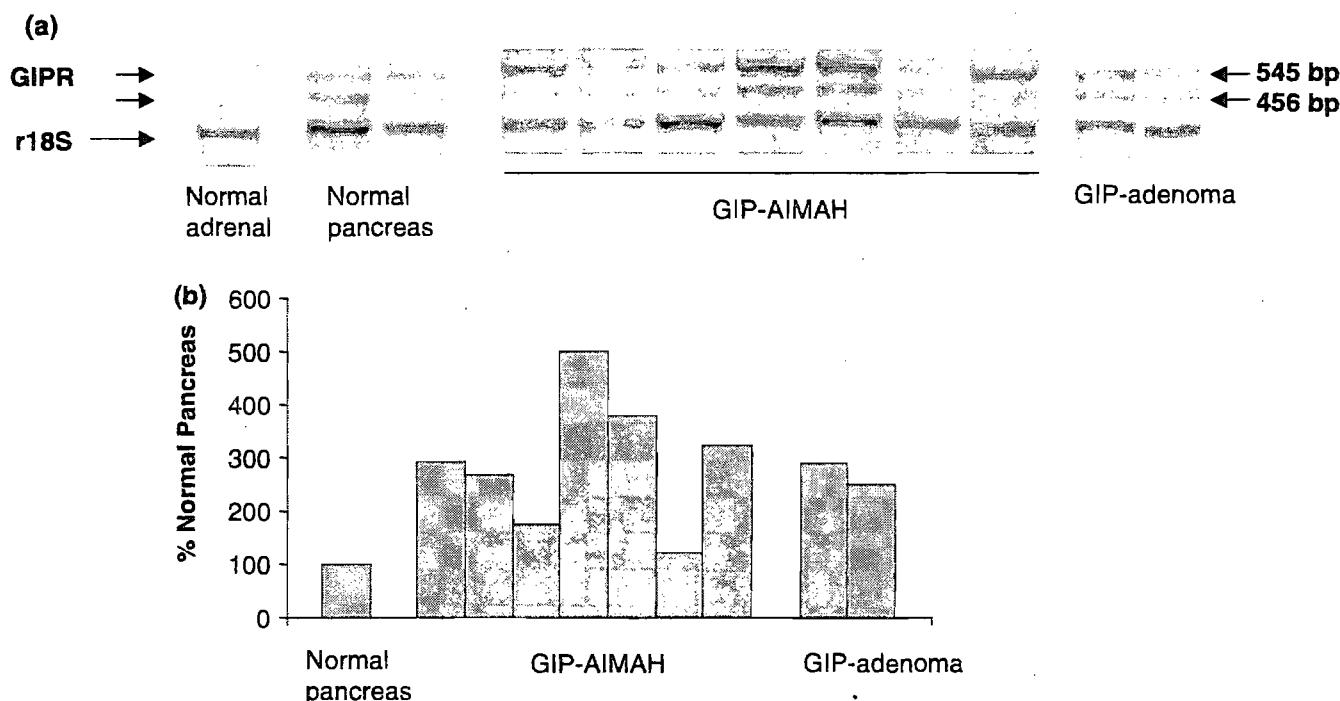


Fig. 1 GIP receptor expression in control pancreas, control adrenal and GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome. (a) Relatively quantitative RT-PCR products in agarose gel, showing the two GIPR isoforms (545 and 456 bp) and the internal control r18S (324 bp). (b) GIPR relative expression compared to control pancreas (arbitrarily considered 100%). In all cases, GIPR was largely overexpressed in GIP-dependent adrenal samples. GIP, glucose-dependent insulinotropic peptide; AIMAH, ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia.

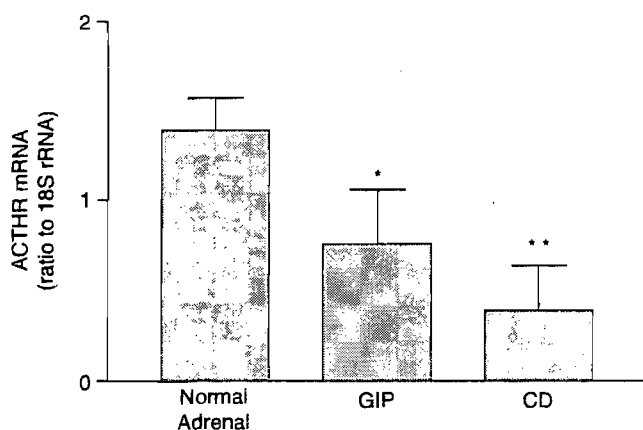


Fig. 2 Expression level of ACTHR mRNA (ACTHR/r18S ratio) in normal adrenals, GIP-dependent adrenal tissues, and adrenals from patients with CD. Each bar and line represents the mean \pm SD of the ratio. Asterisks indicate significantly different from normal at * $P < 0.004$ and ** $P < 0.02$, respectively.

($P = 0.02$). There was a correlation tendency between ACTHR and GIPR expression in GIP-dependent tissues ($r = 0.67$; $P = 0.06$, $n = 9$).

Adrenal steroidogenic enzymes

In normal adrenals, the following ratios of steroidogenic enzymes expressions were noted: CYP11A, 2.37 ± 0.18 ; 3β -HSD, 1.93 ± 0.79 ; CYP21, 3.57 ± 0.25 (Fig. 3). There was a decreased expression of all

enzymes CYP11A (0.66 ± 0.54), 3β -HSD (0.62 ± 0.35) and CYP21 (1.87 ± 1.34) in GIP-dependent CS compared to normal adrenals ($P = 0.02$). There was a decreased expression of 3β -HSD (0.26 ± 0.16 , $P = 0.006$) but not CYP21 (2.61 ± 0.99 , ns) in adrenal tissues from CD patients. In GIP-dependent adrenal tissues there was a correlation between CYP11A and 3β -HSD expression ($r = 0.91$, $P < 0.0001$, $n = 9$) and between CYP11A and CYP21 expression ($r = 0.78$, $P = 0.0025$, $n = 9$). In adrenals from CD patients, there was a positive correlation between the expression of ACTHR and the steroidogenic enzymes ($r = 0.93$ for CYP11A, 0.89 for 3β -HSD and 0.92 for CYP21, $P < 0.05$, $n = 7$). However, there was no significant correlation between ACTHR and steroidogenic enzymes expression in GIP-dependent tissues. We also observed no correlation between GIPR and steroidogenic enzyme expression.

Expression of adrenal transcription factors (TFs)

SF-1 expression (Fig. 4) was present in normal adrenal (0.63 ± 0.10). SF-1 expression showed a tendency of reduction in GIP-dependent tissues (0.37 ± 0.18) and in adrenals from CD patients (0.37 ± 0.23) compared to normal adrenal ($P = 0.07$). There was no difference in SF-1 expression between GIP-dependent and CD adrenal tissues. In GIP-dependent tissues, SF-1 expression was positively correlated with CYP11A ($r = 0.89$, $P < 0.0001$, $n = 9$), 3β -HSD ($r = 0.84$, $P = 0.0005$, $n = 9$) and CYP21 ($r = 0.57$, $P = 0.05$, $n = 9$).

Nur77/NGFI-B (Fig. 4) mRNA expression was significantly lower ($P = 0.009$) in both GIP-dependent CS (0.25 ± 0.20) and CD (0.32 ± 0.15) compared to normal adrenal (0.87 ± 0.32); no significant

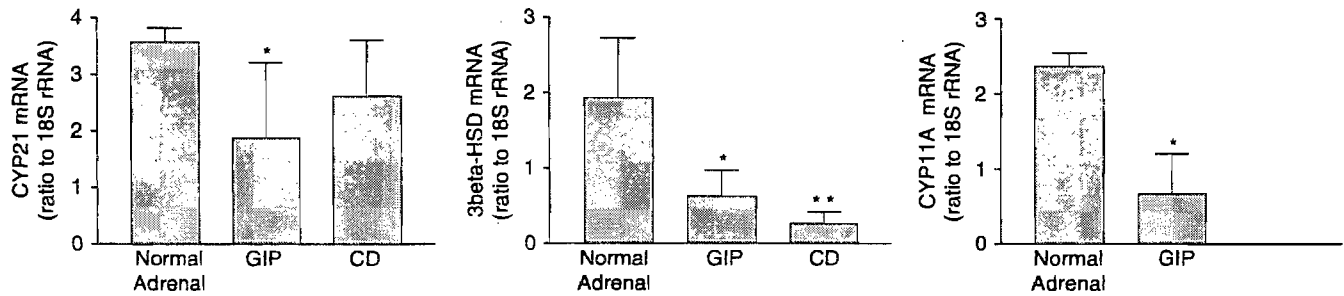


Fig. 3 Expression levels of CYP11A, 3 β -HSD and CYP21 mRNA (CYP11A/r18S, 3 β -HSD/r18S and CYP21/r18S ratios) in normal adrenals, GIP-dependent adrenal tissues and adrenals from patients with CD. Each bar and line represents the mean \pm SD of the ratio. *Significantly different from normal at $P < 0.002$ for CYP21, $P < 0.04$ for 3 β -HSD and $P < 0.04$ for CYP11A. **Significantly different from normal at $P < 0.06$ for 3 β -HSD.

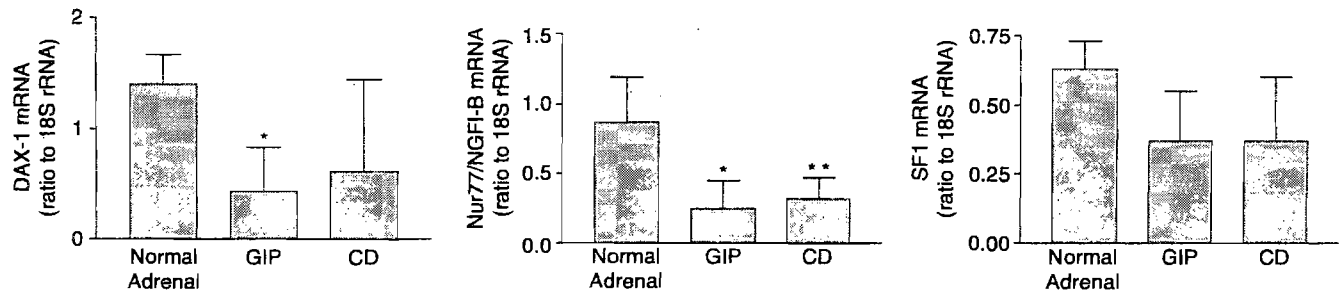


Fig. 4 Expression levels of DAX-1, Nur77/NGFI-B and SF1 mRNA (DAX-1/r18S, Nur77/r18S and SF1/r18S ratios) in normal adrenals, GIP-dependent adrenal tissues and adrenals from patients with CD. Each bar and line represents the mean \pm SD of the ratio. *Significantly different from normal at $P < 0.008$ for DAX-1, and $P < 0.05$ for Nur77/NGFI-B. **Significantly different from normal at $P < 0.09$ for Nur77/NGFI-B.

difference was found between GIP-dependent CS and CD. Nur77/NGFI-B expression did not correlate with expression of the three steroidogenic enzymes in GIP-dependent CS.

DAX-1 mRNA expression was significantly lower ($P = 0.008$) in GIP-dependent CS (0.43 ± 0.40) compared to normal adrenal (1.49 ± 0.27); no significant difference was found between CD (0.61 ± 0.83) and normal adrenal. DAX-1 mRNA expression correlated with CYP11A ($r = 0.86$, $P = 0.0003$, $n = 9$), 3 β -HSD ($r = 0.90$, $P < 0.0001$, $n = 9$) and CYP21 ($r = 0.77$, $P = 0.002$, $n = 9$) expression in GIP-dependent CS.

In GIP-dependent CS, SF-1, DAX-1 and Nur77/NGFI-B expression did not correlate with ACTHR or GIPR expression. In adrenal from CD patients the expression of these TFs presented a positive correlation with ACTHR expression ($r = 0.66$, 0.95 and 0.87 , respectively; $P < 0.05$, $n = 7$).

CREB and CREM

The CREB full-length mRNA transcript (Fig. 5) was present in normal adrenal (0.79 ± 0.15). CREB expression was reduced in GIP-dependent tissues (0.11 ± 0.12 , $P = 0.004$) and in adrenal from CD patients (0.19 ± 0.26 , $P = 0.04$) compared to normal adrenal (0.79 ± 0.15). There was no difference in CREB expression between GIP-dependent and CD adrenal tissues. In GIP-dependent tissues, CREB mRNA mean expression was positively correlated with CYP11A ($r = 0.90$, $P < 0.0001$, $n = 9$), 3 β -HSD ($r = 0.79$, $P = 0.0019$, $n = 9$) and CYP21

($r = 0.66$, $P = 0.017$, $n = 9$) expression. There was also a correlation of CREB mRNA expression with SF-1 ($r = 0.84$, $P = 0.0005$, $n = 9$), Nur77 ($r = 0.79$, $P = 0.006$, $n = 9$) and DAX-1 ($r = 0.85$, $P = 0.0005$, $n = 9$). However, there was no correlation between CREB mRNA expression and ACTHR or GIPR mRNA expression. In adrenal tissues from CD patients, CREB mRNA expression also presented a positive correlation with ACTHR mRNA expression ($r = 0.82$, $P < 0.05$, $n = 7$).

CREM repressors α , β and γ and CREM activator $\tau 2$ (Fig. 5) expression was present in normal adrenal (0.74 ± 0.08) and was reduced ($P = 0.01$) in GIP-dependent tissues (0.24 ± 0.25) and in adrenals from CD patients (0.42 ± 0.27). There was no difference between adrenal tissue from GIP-dependent CS and from CD patients. In GIP-dependent tissues, the expression of CREM repressor isoforms presented a positive correlation with CYP11A ($r = 0.73$, $P = 0.0072$, $n = 9$), 3 β -HSD ($r = 0.61$, $P = 0.03$, $n = 9$) and CYP21 ($r = 0.66$, $P = 0.017$, $n = 9$). There was also a positive correlation with the expression of SF-1 ($r = 0.62$, $P = 0.03$, $n = 9$) and DAX-1 ($r = 0.67$, $P = 0.01$, $n = 9$). There was no correlation between the expression of CREM repressors isoforms and ACTHR or GIPR.

In GIP-dependent CS CREM activators τ , $\tau\alpha$ and $\tau 1$ expression (0.26 ± 0.08) was similar compared to normal adrenal (0.26 ± 0.06), and both were lower than in adrenal from CD patients (0.39 ± 0.07 , $P = 0.03$). No correlation was observed between the expression of CREM activator τ , $\tau\alpha$ and $\tau 1$ isoforms and GIPR, ACTHR, steroidogenic enzymes and transcription factors expression in GIP-dependent CS.

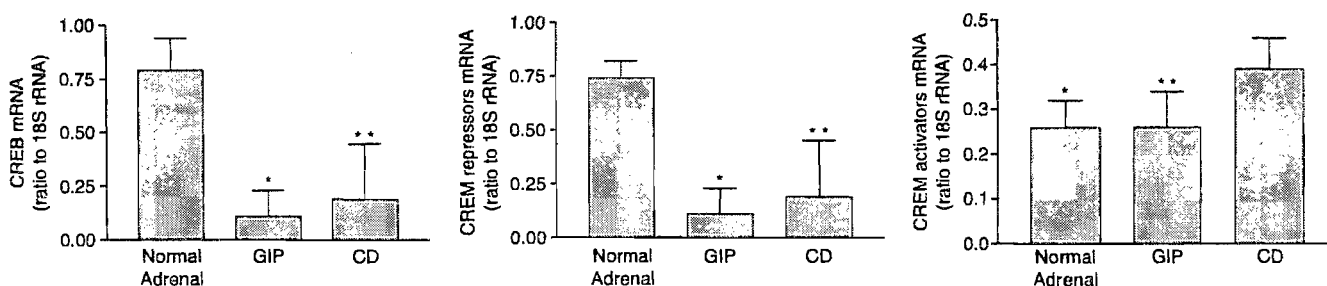


Fig. 5 Expression levels of CREB, CREM-repressor and CREM-activator mRNA (CREB/r18S, CREM-repressors/r18S, and CREM-activators/r18S ratios) in normal adrenals, GIP-dependent adrenal tissues, and adrenals from patients with CD. Each bar and line represents the mean \pm SD of the ratio. *Significantly different from normal at $P < 0.004$ for CREB and $P < 0.01$ for CREM-repressors. **Significantly different from normal at $P < 0.04$ for CREB. For CREM-activator mRNA, asterisks indicate significantly different from adrenal from patients with CD at * $P < 0.03$ for normal adrenal and at ** $P < 0.01$ for GIP-dependent adrenal tissues.

Discussion

In this study we examined the expression of various genes involved in the ACTH-responsive cascade in four new and five previously reported cases of GIP-dependent CS. We observed a marked expression of GIPR mRNA in GIP-dependent adrenal tissues compared to its expression in normal pancreas, where the physiological insulinotrophic activity of GIP occurs.^{18,19} We also observed similar expression of the two main GIPR isoforms in both tissues, indicating that a splice variation is not implicated in the development of GIP-dependent CS, in accordance with previous studies.^{5,8}

In a recent report, there was an overexpression of GIPR in the adrenals of five patients with CD, suggesting that chronic ACTH stimulation may modulate the expression of the GIPR gene.²⁰ Our study does not confirm these data, as we failed to identify overexpression of GIPR in the adrenals of seven patients with CD. However, our finding is consistent with a previous report in a patient with CD⁵ and in two patients with ectopic ACTH secretion.⁸ A few studies have shown a small amount of GIPR mRNA in normal adrenals or in adrenals from CD patients; this GIPR mRNA expression may reflect a contamination of GIPR from endothelial cells rather than its presence in adrenocortical cells.^{21,22}

Most of patients with AIMAH, despite undetectable or very low levels of ACTH, present an exaggerated increase in cortisol following ACTH 1–24 administration.¹ The mechanism of the cortisol response may involve abnormal expression of ACTHR in tissues under the control of aberrant receptors. Indeed, we observed the presence of ACTHR mRNA expression in all GIP-dependent AIMAH and adenomas, in accordance with previous data obtained from a single GIP-dependent adenoma.⁸ The expression of ACTHR in hyperplastic or adenomatous GIP-dependent adrenal tissues, in the absence of detectable levels of ACTH, is intriguing. Previous studies showed that ACTHR mRNA expression was present in cortisol-secreting adrenal tumours but not in nontumoral adjacent atrophic tissues, suggesting that the regulation of ACTHR expression is under different mechanisms in tumoral tissues.^{23,24} The mechanism(s) responsible for the ectopic expression of the GIPR gene might also regulate the expression of the ACTHR gene in GIP-dependent adrenal cells. In fact, in nonhyperplastic or nontumoral adjacent atrophic tissues, ACTHR expression was almost absent in the samples we studied.

Reinforcing this hypothesis, there was a tendency for correlation between the expression of the GIPR and the ACTHR genes in GIP-dependent AIMAH and adenomas.

We also examined the expression of adrenal steroidogenic enzymes, such as CYP11A, 3 β -HSD and CYP21. We found a low mRNA expression of steroidogenic enzymes in GIP-dependent AIMAH; our recent microarray data are in agreement with this result.²⁵ This finding supports the clinical observation that subclinical CS is frequent in AIMAH, and overt clinical CS only becomes apparent after several decades of life, in the presence of a very large adrenal mass.²⁶ Our data, showing low mRNA expression of steroidogenic enzymes in AIMAH, in addition to previous studies using *in situ* hybridization,^{2,16,27} suggest that corticosteroidogenesis may be ineffective in AIMAH. We also found low mRNA expression of these enzymes in the two GIP-dependent adenomas, in contrast to previous reports on cortisol-secreting adenomas not regulated by aberrant receptors.^{28,29}

GIPR as well as ACTHR is coupled to G protein. In GIP-dependent CS, the presence of hypercortisolism is related to GIP stimulation of the GIPR. *In vitro* studies in GIP-dependent tissues demonstrated that, similarly to ACTH, acute GIP stimulation induces steroidogenic enzymes expression, increases cAMP concentration and stimulates cortisol secretion.^{7,8} Reincke *et al.*¹² showed a close correlation between ACTHR and CYP11A mRNA expression in CD and in cortisol-secreting adenomas, but not in adrenal carcinomas, probably as a result of tumour dedifferentiation. We did not observe any correlation between GIPR and steroidogenic enzyme expression in GIP-dependent adrenal tissues. One possible explanation could be that GIPR is better coupled to proliferative signals than to hormone synthesis; in addition, long-term regulation in GIP-dependent adrenal tissues is not clear, might be complex, and the correlation between mRNA and protein levels of steroidogenic enzymes has not been examined.

Most ACTH actions are mediated by specific TFs, including SF-1, Nur77/NGFI-B, DAX-1 and COUP-TF. ACTH induces SF-1 and Nur77/NGFI-B transcription and these TFs modulate the expression of steroidogenic enzymes; DAX-1 and COUP-TF negatively regulate the transcriptional activity of SF-1.^{29–32} These effects on steroidogenic enzyme expression involve PKA-dependent ubiquitous cAMP-responsive TFs, such as CREB and CREM.³³ We found that SF-1, Nur77/NGFI-B and DAX-1 expression was reduced in GIP-dependent

adrenal tissues and was correlated with the expression of the steroidogenic enzymes and cAMP-responsive elements, but not with GIPR or ACTHR. In two previous studies, DAX-1 expression was significantly reduced in cortisol-secreting adenomas, whereas SF-1 levels did not differ from normal adrenals.^{29,34}

In our study, we also show a reduced expression of CREB and CREM repressors and no changes in CREM activator expression in GIP-dependent CS. Expression of CREB and CREM repressors α , β and γ and activator $\tau 2$ was similar in cortisol-producing adenomas compared to normal adrenals, while CREB expression was reduced in carcinomas.³⁵ In the human adrenocortical cancer cell line H295R, a compensatory increase in CREM activator expression was observed.³⁶ Reduced CREM repressor expression and normal CREM activators found in our series could be related to cell proliferation and transformation in GIP-dependent CS.

In summary, we found relatively low expression of various genes of the ACTHR pathway in the adrenals of GIP-dependent CS patients. Although the expression of aberrant receptors plays an important role in steroidogenesis and initiation of cell proliferation,^{2,8,37} additional genetic events might occur, as demonstrated recently by microarray studies,²⁵ altering the activity of the ACTHR pathway.

Acknowledgements

We thank Drs Lynnette K. Nieman (Bethesda, USA), Wouter W. de Herder (Rotterdam, the Netherlands), Helga Gerl (Berlin, Germany), Shereen Ezzat (Toronto, Canada), Pierre M.J. Zelissen (Utrecht, the Netherlands), Olivier Chabre (Grenoble, France), Jean-Pierre Cappaon and Catherine Siame-Mouroit (Lille, France) for providing us with the clinical data and adrenal tissues of some of the GIP-dependent Cushing's syndrome patients. This work was supported by Grant MT-13189 from the Canadian Institutes of Health Research. S.R.A. was supported by CNPq, Brazil.

References

- Mircescu, H., Jilwan, J., N'Diaye, N., Bourdeau, I., Tremblay, J., Hamet, P. & Lacroix, A. (2000) Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 3531–3536.
- Lacroix, A., N'Diaye, N., Tremblay, J. & Hamet, P. (2001) Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews*, **22**, 75–110.
- Groussin, L., Perlemoine, K., Contesse, V., Lefebvre, H., Tabarin, A., Thieblot, P., Schlienger, J.L., Luton, J.P., Bertagna, X. & Bertherat, J. (2002) The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **87**, 1980–1985.
- Lacroix, A., Baldacchino, V., Bourdeau, I., Hamet, P. & Tremblay, J. (2004) Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **15**, 375–382.
- N'Diaye, N., Tremblay, J., Hamet, P., de Herder, W.W. & Lacroix, A. (1998) Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 2781–2785.
- Antonini, S.R., N'Diaye, N., Baldacchino, V., Hamet, P., Tremblay, J. & Lacroix, A. (2004) Analysis of the putative regulatory region of the GIP-receptor gene in GIP-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **91**, 171–177.
- Lebrethon, M.C., Avallet, O., Reznik, Y., Archambeaud, F., Combes, J., Usdin, T.B., Narboni, G., Mahoudeau, J. & Saez, J.M. (1998) Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 4514–4519.
- Chabre, O., Liakos, P., Vivier, J., Chaffanjon, P., Labat-Moleur, F., Martinie, M., Bottari, S.P., Bachelot, L., Chambaz, E.M., Defaye, G. & Feige, J.J. (1998) Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 3134–3143.
- Lebrethon, M.C., Naville, D., Begeot, M. & Saez, J.M. (1994) Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *Journal of Clinical Investigation*, **93**, 1828–1833.
- Mountjoy, K.G., Bird, I.M., Rainey, W.E. & Cone, R.D. (1994) ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **99**, R17–R20.
- Morita, T.M., Imai, T., Murata, Y., Kambe, F., Funahashi, H., Takagi, H. & Seo, H. (1995) Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) increases the expression of its own receptor gene. *Endocrine Journals*, **42**, 475–480.
- Reincke, M., Beuschlein, F., Latronico, A.C., Arlt, W., Chrousos, G.P. & Allolio, B. (1997) Expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in human adrenocortical neoplasms: correlation with P450_{scc} expression. *Clinical Endocrinology*, **46**, 619–626.
- Croughs, R.J., Zelissen, P.M., Van Vroonhoven, T.J., Hofland, L.J., N'Diaye, N., Lacroix, A. & de Herder, W.W. (2000) GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH. *Clinical Endocrinology*, **52**, 235–240.
- Bourdeau, I. & Stratakis, C.A. (2002) Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Annals of the New York Academy of Science*, **968**, 240–255.
- Wada, N., Kubo, M., Kijima, H., Ishizuka, T., Saeki, T., Koike, T. & Sasano, H. (1996) Adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical studies of steroidogenic enzymes and post-operative course in two men. *European Journal of Endocrinology*, **134**, 583–587.
- Sasano, H., Suzuki, T. & Nagura, H. (1994) ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. *Modern Pathology*, **7**, 215–219.
- Spencer, W.E. & Christensen, M.J. (1999) Multiplex relative RT-PCR method for verification of differential gene expression. *Biotechniques*, **27**, 1044–1046, 1048–1050, 1052.
- Beck, B. (1989) Gastric inhibitory polypeptide: a gut hormone with anabolic functions. *Journal of Molecular Endocrinology*, **2**, 169–174.
- Fehmann, H.C., Gherzi, R. & Goke, B. (1995) Regulation of islet hormone gene expression by incretin hormones. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, **103**, 56–65.
- Swords, F.M., Alwin, S., Perry, L., Arola, J., Grossman, A.B., Monson, J.P. & Clark, A.J. (2005) The aberrant expression of gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic ACTH exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **90**, 3009–3016.

- 21 Usdin, T.B., Mezey, E., Button, D.C., Brownstein, M.J. & Bonner, T.I. (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*, **133**, 2861–2870.
- 22 Zhong, Q., Bollag, R.J., Dransfield, D.T., Gasalla-Herraiz, J., Ding, K.H., Min, L. & Isales, C.M. (2000) Glucose-dependent insulinotropic peptide signaling pathways in endothelial cells. *Peptides*, **21**, 1427–1432.
- 23 Beuschlein, F., Fassnacht, M., Klink, A., Allolio, B. & Reincke, M. (2001) ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *European Journal of Endocrinology*, **144**, 199–206.
- 24 Imai, T., Sarkar, D., Shibata, A., Funahashi, H., Morita-Matsuyama, T., Kikumori, T., Ohmori, S. & Seo, H. (2001) Expression of adrenocorticotropin receptor gene in adrenocortical adenomas from patients with Cushing syndrome: possible contribution for the autonomous production of cortisol. *Annals of Surgery*, **234**, 85–91.
- 25 Bourdeau, I., Antonini, S., Lacroix, A., Kirschner, L.S., Lorang, D., Libutti, S.K. & Stratakis, C.A. (2004) Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasias confirms clinical heterogeneity and identifies several genes as molecular mediators. *Oncogene*, **23**, 1575–1585.
- 26 Bourdeau, I., D'Amour, P., Hamet, P., Boutin, J.M. & Lacroix, A. (2001) Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5534–5540.
- 27 Aiba, M., Hirayama, A., Iri, H., Ito, Y., Fujimoto, Y., Mabuchi, G., Murai, M., Tazaki, H., Maruyama, H., Saruta, T., Suda, T. & Demura, H. (1991) Adrenocorticotrophic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia as a distinct subtype of Cushing's syndrome. Enzyme histochemical and ultrastructural study of four cases with a review of the literature. *American Journal of Clinical Pathology*, **96**, 334–340.
- 28 Suzuki, H., Shibata, H., Maruyama, T., Ishimura, Y. & Saruta, T. (1995) Significance of steroidogenic enzymes in the pathogenesis of hyperfunctioning and non-hyperfunctioning adrenal tumor. *Steroids*, **60**, 42–47.
- 29 Shibata, H., Ikeda, Y., Mukai, T., Morohashi, K., Kurihara, I., Ando, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Murai, M., Saito, I. & Saruta, T. (2001) Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Molecular Genetics and Metabolism*, **74**, 206–216.
- 30 Li, Y. & Lau, L.F. (1997) Adrenocorticotrophic hormone regulates the activities of the orphan nuclear receptor Nur77 through modulation of phosphorylation. *Endocrinology*, **138**, 4138–4146.
- 31 Parker, K.L. & Schimmer, B.P. (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, **18**, 361–377.
- 32 Babu, P.S., Bavers, D.L., Beuschlein, F., Shah, S., Jeffs, B., Jameson, J.L. & Hammer, G.D. (2002) Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology*, **143**, 665–673.
- 33 Simpson & Waterman (1988) Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annual Review of Physiology*, **50**, 427–440.
- 34 Reincke, M., Beuschlein, F., Lalli, E., Arlt, W., Vay, S., Sassone-Corsi, P. & Allolio, B. (1998) DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **83**, 2597–2600.
- 35 Peri, A., Luciani, P., Conforti, B., Baglioni-Peri, S., Cioppi, F., Crescioli, C., Ferruzzi, P., Gelmini, S., Arnaldi, G., Nesi, G., Serio, M., Mantero, F. & Mannelli, M. (2001) Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **86**, 5443–5449.
- 36 Groussin, L., Massias, J.F., Bertagna, X. & Bertherat, J. (2000) Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 345–354.
- 37 Longo-Mazzucco, T., Chabre, O., Feige, J.J. & Thomas, M. (2004) Transforming potential of the GIP receptor gene in adrenal cortical cells; a step towards the etiology of food-dependent Cushing's syndrome. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*, **65**, C024:267.
- 38 Gerl, H., Rohde, W., Biering, H., Schulz, N. & Lochs, H. (2000) Food-dependent Cushing syndrome of long standing with mild clinical features. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, **125**, 1565–1568.
- 39 de Herder, W.W., Hofland, L.J., Usdin, T.B., de Jong, F.H., Uitterlinden, P., van Koetsveld, P., Mezey, E., Bonner, T.I., Bonjer, H.J. & Lamberts, S.W. (1996) Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **81**, 3168–3172.
- 40 Kaye-Wandover, K.M. & White, P.C. (2000) Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **85**, 2519–2525.